



Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

**ESPECTRO DE SOBRECRECIMIENTOS ASOCIADOS A *PIK3CA*:
EXPANSIÓN DE FENOTIPO Y GENOTIPO, Y DESARROLLO DE
UN PROTOCOLO DIAGNÓSTICO.**

TESIS DOCTORAL

Gema Gordo Trujillo

Madrid, 2018



Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

ESPECTRO DE SOBRECRECIMIENTOS ASOCIADOS A *PIK3CA*: EXPANSIÓN DEL FENOTIPO Y GENOTIPO, Y DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DIAGNÓSTICO.

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

Gema Gordo Trujillo

Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid (UAM)

DIRECTORES DE LA TESIS:

Dr. Víctor Martínez González

Dr. Pablo Lapunzina

Instituto de Genética Médica y Molecular, INGEMM. Hospital Universitario La Paz.
Madrid

Dr. **Víctor Martínez González**, Investigador CIBERER (U753), responsable de la Sección de Malformaciones Vasculares en el Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), del Hospital Universitario La Paz

CERTIFICA:

Que Doña **Gema Gordo Trujillo**, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado la presente Tesis Doctoral “**Espectro de Sobrecrecimientos asociados a *PIK3CA*: expansión del fenotipo y genotipo, y desarrollo de un protocolo diagnóstico.**” y que a su juicio reúne plenamente todos los requisitos necesarios para optar al **Grado de Doctor en Biociencias Moleculares**, con **Mención al Doctorado Internacional**, a cuyos efectos será presentada en la Universidad Autónoma de Madrid. El trabajo ha sido realizado bajo mi dirección autorizando su presentación ante el tribunal calificador.

Y para que conste, se extiende el presente certificado.

Madrid, 13 de Marzo de 2018

Fdo: Director de Tesis

Dr. Víctor Martínez González

Dr. **Pablo Lapunzina**, Director científico del CIBERER, Investigador principal CIBERER de la Unidad U753, Director-Coordinador del Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), del Hospital Universitario La Paz

CERTIFICA:

Que Doña **Gema Gordo Trujillo**, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado la presente Tesis Doctoral “**Espectro de Sobrecrecimientos asociados a *PIK3CA*: expansión del fenotipo y genotipo, y desarrollo de un protocolo diagnóstico**” y que a su juicio reúne plenamente todos los requisitos necesarios para optar al **Grado de Doctor en Biociencias Moleculares**, con **Mención al Doctorado Internacional**, a cuyos efectos será presentada en la Universidad Autónoma de Madrid. El trabajo ha sido realizado bajo mi dirección autorizando su presentación ante el tribunal calificador.

Y para que conste, se extiende el presente certificado.

Madrid, 13 de Marzo de 2018

Fdo: Director de Tesis

Dr. Pablo Lapunzina

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM-CIBERER-IdiPAZ) del Hospital Universitario La Paz entre los años 2015 y 2018, bajo la supervisión del Dr. Víctor Martínez-Glez y el Dr. Pablo Lapunzina.

Este trabajo fue financiado en su mayor parte por el proyecto de investigación “PIK3CA-Todos Somos Raros” (referencia PI-17) obtenido a través de la convocatoria competitiva “Todos Somos Raros”, gestionada por las tres entidades promotoras de la Telemaratón RTVE: Fundación Isabel Gemio, Federación ASEM y la Federación Española de Enfermedades Raras. Dicho proyecto fue gestionado por el Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER).

Asimismo, las siguientes becas y ayudas también han contribuido a su desarrollo:

- Proyecto de Investigación en Salud FIS PI15/01481, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).
- Beca pre-doctoral en el Programa para visitantes del NIH (*National Institutes of Health*) bajo la supervisión del Dr. Leslie Biesecker, jefe de la Sección *Medical Genomic & Metabolic Genetics*, en el *National Human Research Institute*. Periodo: 31 de Julio de 2017 a 31 de Octubre de 2017.

*A mí familia,
en especial a mis padres, abuelos y Fran*

AGRADECIMIENTOS

Si estás leyendo estas líneas significa que llegó el final de la escritura de esta Tesis Doctoral, y sí digo final, porque a pesar de encontrarse al principio del documento, se trata de las últimas líneas que estoy escribiendo. He querido dejar para el final este apartado para poder tomarme un respiro y escribir con calma el agradecimiento a todas aquellas personas que han participado y han hecho posible el desarrollo de este proyecto. Este manuscrito sólo muestra la punta del iceberg de todo el trabajo realizado durante estos años, y no desde que comencé a realizar esta tesis, si no desde el primer día que pisé el INGEMM, el lugar que me ha visto crecer como científica, como persona, y que me ha ido forjando hasta lo que soy ahora.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de tesis, el Dr. Pablo Lapunzina y el Dr. Víctor Martínez-Glez, que me han guiado durante todos estos años. Pablo, aún me acuerdo de aquel día, allá por Julio de 2012, en el que te sentaste conmigo a enseñarme cómo se diseñaban los *primers*. No quería perder esta oportunidad para darte las gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio y comenzar en el mundillo de la investigación, gracias de corazón. Víctor, gracias por pensar en mi para realizar este proyecto tan bonito que finalmente hemos conseguido. Gracias a ello he podido continuar profundizando en lo que comencé mi carrera investigadora, y he aprendido muchísimo, tanto en lo que tiene que ver con el laboratorio, como con la vida misma. Con este trabajo estamos aportando nuestro granito de arena a la investigación de las enfermedades raras, y sobre todo a los pacientes que han formado parte de este “Todos Somos Raros”.

Este proyecto no hubiera sido posible sin la ayuda del Dr. Juan Carlos López-Gutiérrez, que tantas muestras nos envía y que nos ha abierto las puertas al gran mundo de las malformaciones vasculares. Gracias JC. Y gracias a todos los doctores que han participado en el proyecto enviándonos muestras de toda España.

Gracias a mi súper equipo OGS por estar siempre ahí, por vuestro apoyo. Jair, gracias por tu ayuda durante todos estos años, hemos estado codo con codo desde el primer día que llegué al INGEMM, y me has enseñado muchas de las cosas que sé ahora; gracias por los mensajes cuando estábamos al otro lado del charco, por tu ayuda en la corrección de la tesis y tu apoyo. Irene, por nuestros cinco minutitos al sol después de comer, por nuestras conversaciones y sobre todo por tu ayuda; hemos compartido un montón de momentos juntas, y sabes que puedes contar conmigo para lo que necesites. La foto que me enviasteis Jair y tú cuando estaba en Iguazú atrapada fue genial ;). Pedro, gracias por todo, porque siempre estás ahí cuando se te necesita, por tus consejos, y por todo lo que me has ayudado y enseñado, anda que no nos reímos aquel día aprendiendo a extraer ADN con Irene, a la caza

de la medusa! =) Eva, por esas risas que se oyen desde que entras por la puerta y que nos contagian a todos, por las aventuras de los mellis alegrándonos las mañanas, y por las dudas que siempre me resuelves. Rubén, nuestro adoptado OGS, por esos cafecitos de media mañana con olor a tarta, y por tu ayuda siempre que lo he necesitado, anda que no te he dado la lata con el pH y la polimerasa! A todos los estudiantes que han pasado por el lab, y que han dejado su pequeña huella.

Gracias a las integrantes de mi equipo MALVA, Lara y Noelia, por vuestra ayuda en el lab, gracias a vosotras aprendí a trabajar con bacterias y células. No me puedo olvidar de Lucía Pedrosa, que estuvo con nosotros realizando su TFM, me ayudó con los pseudogenes y las *Long Range-PCRs*, y con la que pasé grandes momentos, espero que disfrutaras tu estancia con nosotros.

Gracias al equipo de bioinformática, que tanto nos ha ayudado con el desarrollo de los protocolos para la detección de mosaicos: Ángela, Kristina, Juan Carlos, David, y en especial a Mario, que me ha ayudado siempre que lo he necesitado

Por supuesto gracias a todas las personas que forman o han formado parte del INGEMM, y que han estado en mi día a día: Bea, Rubén, Ascen, Carmen, Julián, Charo, Inma², Laura, Fe, Olga, Sixto, Jimena, Carlos, Karen, Ángel, Alfonso, Alberta, Sara, Carol, Elena, Luis, Fernando, María, Rocío, Mariví, Vicky, Juanan, Ángelo, Pilar², Mercedes, José Carlos, Sonia, Carmen (mil gracias por todo lo que me has ayudado, por toda la brasa que te he dado con los funcionales, gracias gracias gracias!), MariCruz, Asun y un largo etc. de grandísimas personas.

Gracias al laboratorio del Dr. Víctor L. Ruíz por su ayuda con parte de los estudios funcionales de este trabajo. Adri, Carol, Lucía, Cristina, gracias por vuestra ayuda.

Al equipo de la Dra. Carmen Ayuso por la colaboración para la realización de ddPCR: a Cristina Villaverde por enseñarme todo sobre la realización de la técnica y a la Dra. Ana Bustamante por su ayuda con el análisis de resultados.

No puedo olvidarme de todos los pacientes que forman parte de este proyecto, así como de sus familiares, sin ellos esta tesis no podría haberse llevado a cabo. Gracias a la Asociación de pacientes de Macrocefalia-Malformación Capilar.

Thanks to Biesecker' lab for the three months that I was there, not only for the things I learned in the lab, also for your welcome and making me feel like one more of the group. Les, thank you for all your help and tips. Marj, thanks for your help during my stay and also now,

because you keep on helping me. I was your shadow during those months in the lab, and we'll be always united by our birthday! Hahaha. Kate, thanks for allowing me to stay in your house during my first days in the US, and for your help all the time, I enjoyed so much with you, thanks so much friend!!! Jasmine, my friend, thanks for your help inside and outside the lab. Henoke, Jen, Jeff, Julie, Kim, Ashlyn, Ilana, Jasmine2... thank you! Barb and Les thanks for opening your house to me and making me feel like in my home, like one more of your family. My stay in USA was an amazing experience. I'll be grateful always.

Diego, Anja and Germán for all the moments together in Washington; an English course brought us together and made us a family. Un brasileño, una alemana, un argentino y una española... parece que vaya a comenzar a contar un chiste!

A mis amigas, mi aquelarre particular (Luci, Lore, Bea, Lau, Pau, Carmen y Rachel), gracias por estar ahí siempre, aunque estos meses os haya tenido un poco abandonadas, sé que puedo contar con vosotras, gracias por vuestro apoyo y por todos esos momentos juntas. Luci, gracias por tu ayuda con la tesis también, tener a una de tus mejores amigas en el lab de al lado es todo un privilegio! =)

A mi tocaya Gema, y mi amiga Irene. A mis compis de la uni (Oxana, Nathaly, Ana, Antonio...) que me encanta verlos de vez en cuando y ponernos al día.

Por último, y no por ello menos importante, sino todo lo contrario, gracias a mi familia. A mis padres, Mariana y Pedro, por su apoyo incondicional, y por su ayuda, por el cariño que me dais cada día, por los valores que me habéis inculcado y por haberme enseñado a luchar por mis sueños. Esta tesis es vuestra, sin vosotros no habría llegado hasta donde estoy ahora. Gracias por todo, sois los mejores, os quiero. A mis abuelos, Gregorio e Ignacia, Donato y Laureana, que tuvieron que trabajar muy duro para que hoy estemos así, gracias por todos vuestros esfuerzos y sacrificios y por todo el amor que nos dais y diste, esto va por vosotros. A mis tíos Toñi, Juanma, Paco, Carmen, Grego y Noelia, y mis primos Juanma, Iván, Dani, Rubén, Aarón e Ylenia (ya sabéis que sois como mis hermanos!), por estar ahí siempre, por ser una piña, siempre unidos. A mis tíos Ana, Carlos, Lali y Gregorio, y mis primos Edu, Sara y Alicia.

A Fran, mi amor del instituto y de toda la vida, por aguantarme cada día, por todos nuestros momentos vividos y los que nos quedan por vivir, por apoyarme y estar siempre a mi lado, por todo. Anda que no has aprendido palabras raras desde que me adentré en este mundillo eh! ;)

En definitiva, GRACIAS A TODOS los que habéis sido y sois parte de mi vida tanto profesional como personal.

RESUMEN / SUMMARY

Resumen

El sobrecrecimiento segmentario y las malformaciones vasculares son dos características clínicas prevalentes en los síndromes causados por mutaciones germinales y/o somáticas en diferentes genes de la ruta PI3K/AKT/mTOR: Megalencefalia-polimicrogiria-polidactilia-hidrocefalia (*AKT3* y *PIK3R2*), Espectro de Sobrecrecimientos Asociados a *PIK3CA* (PROS; *PIK3CA*) o síndrome de Smith-Kingsmore (*mTOR*), entre otros. En el caso de PROS, debido a que las mutaciones en *PIK3CA* ocurren como un evento post-cigótico, causando mosaicismo somático, el espectro fenotípico dentro de este grupo varía ampliamente en severidad y localización dependiendo del tipo celular afectado y del tiempo durante el desarrollo embrionario en el que surgió la mutación. Las características clínicas no siempre son constantes entre los diferentes síndromes incluidos en PROS, existiendo además un gran solapamiento fenotípico, dificultando el diagnóstico clínico y molecular.

En esta Tesis Doctoral se estudió clínica y molecularmente una cohorte de 96 pacientes con características clínicas compatibles con el espectro PROS, incluyendo pacientes con diagnóstico de Macrocefalia-Malformación Capilar, síndrome CLOVES, macrodactilia y otros con fenotipo difuso, así como una serie de pacientes con DCMO, una entidad clínica, de causa desconocida y con características similares al espectro PROS. El objetivo fue ampliar el fenotipo y el genotipo del espectro PROS, y establecer un protocolo que permita un mejor diagnóstico clínico y molecular de los pacientes y una mejor comprensión de las patologías incluidas en el espectro. Para ello se utilizaron tres paneles de genes diferentes de secuenciación masiva (NGS) para analizar el ADN extraído de muestras de linfocitos de sangre periférica, saliva y/o tejido afectado de 85 de estos pacientes. Las variantes candidatas se validaron utilizando tres metodologías alternativas y se realizaron estudios funcionales en variantes no identificadas previamente. Se detectaron 23 variantes diferentes en *PIK3CA* en pacientes con PROS. Además de en este gen, se detectaron variantes en otros tres genes incluidos en la ruta PI3K/AKT/mTOR en seis pacientes, cuatro de ellos con variantes en *mTOR* (tres en línea germinal y uno en mosaico somático), un paciente con una variante en mosaico en *AKT3* y el último con una variante en *PTEN*. Asimismo, se identificó al primer caso de DCMO con una variante probablemente patogénica en *PIK3CA*.

La combinación de los estudios clínicos y moleculares presentados en esta Tesis Doctoral amplía el conocimiento fenotípico y genotípico del espectro PROS, y establece un protocolo experimental y bioinformático para el diagnóstico de estos pacientes mediante el uso de NGS con grandes profundidades de lecturas.

Summary

Segmental overgrowth and vascular malformations are two prevalent clinical features among different syndromes caused by germline or somatic mutations in different genes in the PI3K/AKT/mTOR pathway: Megalencephaly-polymicrogyria-polydactyly-hydrocephalus syndrome (*AKT3* and *PIK3R2*), PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum (PROS; *PIK3CA*) or Smith-Kingsmore syndrome (*mTOR*), among others. In the case of PROS, as mutations in *PIK3CA* occurs as a post-zigotic event, causing somatic mosaicism, the phenotypic spectrum within this group varies greatly in severity and location depending on the affected cellular type and the time of the embryonic development in which the mutation arose. Clinical characteristics are not always consistent between the different syndromes included in PROS, and there is also phenotypic overlap, making the clinical and molecular diagnosis difficult.

In this Doctoral Thesis, a cohort of 96 patients with clinical characteristics compatible with the PROS spectrum was studied clinically and molecularly, including patients with a diagnosis of Macrocephaly-Capillary Malformation, CLOVES syndrome, macrodactyly and others with diffuse phenotype, as well as a series of patients with DCMO, a clinical entity of unknown cause and with similar characteristics to PROS spectrum. The objective was to expand the phenotype and genotype of PROS spectrum, and to establish a protocol that allows a better clinical and molecular diagnosis of the patients, and a better understanding of the pathologies included in the spectrum. For this, three different massive sequencing (NGS) genes panels were used to analyze the DNA extracted from blood, saliva and/or affected tissue from 85 of these patients. Candidate variants were validated using three alternative methodologies and functional studies were performed on mutations not previously reported.

We detected 23 different *PIK3CA* variants in PROS. In addition to this gene, variants were detected in three other genes included in the PI3K/AKT/mTOR pathway in six patients referred previously as MCAP or PROS: four of them with *mTOR* variants (three germline and one somatic), one patient with a mosaic *AKT3* variant, and the last one with a *PTEN* variant. Also, we identified the first patient with clinical diagnosis of DCMO and a post-zigotic variant in *PIK3CA*.

The combination of the clinical and molecular studies presented in this doctoral thesis broadens the phenotypic and genotypic knowledge of the PROS spectrum, and establishes an experimental and bioinformatic protocol for the diagnosis of these patients through the use of NGS with great reading depths.

ÍNDICE

Resumen.....	3
Summary	5
Abreviaturas	11
1. Introducción	17
1.1 Sobrecrecimiento y anomalías vasculares	19
1.2 Ruta de señalización celular PI3K/AKT/mTOR.....	21
1.3 <i>PIK3CA</i>	22
1.4 Mosaicismo somático.....	23
1.4.1 Detección de mosaicismo somático	25
1.5 Espectro de sobrecrecimientos asociados a <i>PIK3CA</i>	28
1.5.1 Macrocefalia-Malformación Capilar.....	32
1.5.2 Síndrome CLOVES.....	34
1.5.3 Macroductilia.....	35
1.5.4 Malformaciones capilares difusas con sobrecrecimiento: DCMO	35
2. Hipótesis y objetivos	37
3. Material y métodos	41
3.1 Pacientes y muestras.....	43
3.2 Estudios de secuenciación masiva (NGS)	44
3.2.1 Diseño de los paneles de genes	44
3.2.2 Experimentos de secuenciación masiva.....	46
3.2.3 Análisis bioinformático.....	46
3.2.4 Análisis y filtrado de variantes	49
3.3 Validación de variantes	49
3.3.1 Secuenciación Sanger.....	50
3.3.2 Pirosecuenciación.....	51
3.3.3 <i>Droplet digital</i> PCR (ddPCR)	53
3.3.4 RFLP (de las siglas en inglés <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>).....	54
3.4 Estudios funcionales.....	55
Mutagénesis dirigida	55
Transfección celular	57
Western Blot	58
3.5 Análisis estadísticos.....	59
4. Resultados	61
4.1 Pacientes y muestras.....	63

4.2	Desarrollo tecnológico	63
4.2.1	Panel Mosaicos y panel MALVA	63
4.2.2	Variantes localizadas en regiones de alta homología	66
4.3	Resultados moleculares	68
4.3.1	Descripción de las variantes causales detectadas.....	70
4.3.2	Variantes detectadas en el gen <i>PIK3CA</i>	80
4.3.3	Variantes detectadas en el gen <i>AKT3</i>	83
4.3.4	Variantes detectadas en el gen <i>mTOR</i>	85
4.4	Revisión del fenotipo.....	87
4.4.1	Espectro de Sobrecrecimientos asociados a <i>PIK3CA</i>	87
4.4.2	Paciente con variante en <i>AKT3</i> – Macrocefalia-Malformación Capilar.....	92
4.4.3	Pacientes con variantes en <i>mTOR</i> - Síndrome de Smith-Kingsmore.....	94
5.	Discusión	96
5.1	Estudio de la cohorte de pacientes	98
5.2	Desarrollo de un protocolo experimental y diagnóstico.....	110
6.	Conclusiones.....	114
7.	Conclusions	118
8.	Bibliografía	122
Anexo I: Información adicional		I
Anexo II: Cuestionario clínico		XI
Anexo III: Artículos científicos		XXI

ABREVIATURAS

A continuación se presentan por orden alfabético las abreviaturas utilizadas en la presente Tesis Doctoral, que corresponden a nombres de genes y proteínas, abreviaturas propias de la tesis, o términos científicos descritos inicialmente en lengua inglesa, utilizados comúnmente de esta forma a través de siglas:

ACMG	Colegio Americano de Genética Médica (del inglés, <i>American College of Medical Genetics</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT1	Del inglés, <i>V-AKT murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
AKT2	Del inglés, <i>V-AKT murine thymoma viral oncogene homolog 2</i>
AKT3	Del inglés, <i>V-AKT murine thymoma viral oncogene homolog 3</i>
Amp	Ampicilina
APS	Adenosina 5 fosfosulfato
ATP	Adenosin trifosfato
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamientos (del inglés, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BLK	Queratosis liquenoide benigna (del inglés, <i>Benign Lichenoid Keratoses</i>)
Cels.	Células
CGH	Hibridación genómica comparativa (del inglés, <i>Comparative Genomic Hybridization</i>)
CLAPO	Síndrome CLAPO (del inglés, <i>Capillary malformation of the lower lip, Lymphatic malformation predominant on the face and neck, Asymmetry, and Partial/generalized Overgrowth</i>)
CLOVES	Síndrome CLOVES (del inglés, <i>Congenital Lipomatous, Overgrowth, Vascular malformation and Epidermal Nevi and Spinal/Skeletal Anomalies and/or Scoliosis</i>)
CNV	Variación en el número de copias (del inglés, <i>Copy Number Variation</i>)
Col.	Colaboradores
DCMO	Malformaciones capilares difusas con sobrecrecimiento (del inglés, <i>Diffuse capillary malformation with overgrowth</i>)
ddPCR	PCR digital (del inglés, <i>droplet digital PCR</i>)
DI	Discapacidad Intelectual
Diag.	Diagnóstico
DMEG	Megalencefalia displástica (del inglés, <i>Dysplastic Megalencephaly</i>)
EN	Nevus epidérmico (del inglés, <i>Epidermal Nevi</i>)

FAO	Sobrecrecimiento fibroadiposo (del inglés, <i>Fibroadipose Overgrowth</i>)
FAT	FRAP (FKBP-proteína asociada a rapamicina)/ATM (ataxia telangiectasia mutada)/TRRAP (dominio proteico asociado a transformación/transcripción [del inglés, (<i>FKBP-rapamycin-associated protein</i>)/ATM (<i>ataxia telangiectasia mutated</i>)/TRRAP (<i>transformation/transcription domain-associated protein</i>)]
FATC	FATC-terminal
FAV	Fístula ArterioVenosa
FFPE	Tejido embebido en parafina
GAP	Proteína activadora de GTPasa (del inglés, <i>GTPase-activating protein</i>)
gDNA	ADN genómico
GFP	Proteína verde fluorescente (del inglés, <i>Green Fluorescent Protein</i>)
GOF	Ganancia de función (del inglés, <i>Gain Of Function</i>)
H	Hombre
HEAT	Del inglés, <i>Huntington, Elongation factor 3, protein phosphatase 2A, and the yeast kinase TOR1</i> .
HH	Hemihiperplasia
HHML	Hemihiperplasia múltiple lipomatosa (del inglés, <i>Hemihyperplasia-Multiple Lipomatosis</i>)
HMEG	Hemimegalencefalia
HPO	Código de ontología del fenotipo humano (del inglés, <i>Human Phenotype Ontology</i>)
IGV	Visor integrativo del genoma (del inglés, <i>Integrative Genome Viewer</i>)
ILM	Malformaciones linfáticas aisladas (del inglés, <i>Isolated Lymphatic Malformation</i>)
INDELs	Inserciones/Delecciones
INGEMM	Instituto de Genética Médica y Molecular
ISSVA	Sociedad internacional para el estudio de las anomalías vasculares (del inglés, <i>International Society for the Study of Vascular Anomalies</i>)
Kb	Kilobases
KTS	Síndrome de Klippel-Trenaunay
LOF	Pérdida de función (del inglés, <i>Loss Of Function</i>)
LR-PCR	PCR de cadena larga (del inglés, <i>Long Range-PCR</i>)
M	Mujer
MALVA	Malformaciones Vasculares
MAV	Malformación ArterioVenosa

MC	Malformación Capilar
MCAP	Macrocefalia-Malformación Capilar (del inglés, <i>Megalencephaly-Capillary Malformation</i>)
ML	Malformación Linfática
MPPH	Síndrome de <i>Megalencephalia-Polimicrogria-Polidactilia-Hidrocefalia</i> (del inglés, <i>Megalencephaly-polymicrogyria-polydactyly-hydrocephalus syndrome</i>)
mTOR	Diana de rapamicina en mamíferos (del inglés, <i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>)
mTORC1	Complejo mTOR de tipo 1 (del inglés, <i>mTOR complex 1</i>)
mTORC2	Complejo mTOR de tipo 2 (del inglés, <i>mTOR complex 2</i>)
MV	Malformación vascular
Neg.	Negativo
NGS	Secuenciación masiva (del inglés, <i>Next Generation Sequencing</i>)
ORF	Marco de lectura abierto (del inglés, <i>Open Reading Frame</i>)
P	Fosfato (del inglés, <i>Phosphate</i>)
P85-BD	Dominio de unión a la subunidad P-85 (del inglés, <i>P85-Binding Domain</i>)
Pb	Pares de bases
pBS	pBlueScript
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDK1	Quinasa piruvato deshidrogenasa, isoenzima 1 (del inglés, <i>Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1</i>)
PHTS	Trastornos relacionados con PTEN (del inglés, <i>PTEN hamartoma tumor syndrome</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa (del inglés, <i>phosphatidylinositol 3 Kinase</i>)
PIK3CA	Fosfatidilinositol 3 quinasa, subunidad catalítica alfa (del inglés, <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase, Catalytic, Alpha</i>)
PIK3R2	Fosfatidilinositol 3 quinasa, subunidad reguladora 2 (del inglés, <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase, regulatory subunit 2</i>)
PIP2	Fosfatidilinositol 3, 4, 5-bifosfato (del inglés, <i>phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate</i>)
PIP3	Fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (del inglés, <i>phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate</i>)
Pirosec.	Pirosecuenciación
Prob.	Probablemente

PROS	Espectro de Sobrecrecimientos Asociados a PIK3CA (del inglés, <i>PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum</i>)
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
Ras-BD	Dominio de unión Ras (del inglés, <i>Ras-Binding Domain</i>)
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (del inglés, <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RNF125	Proteína de dedo en anillo 125 (del inglés, <i>ring finger protein 125</i>)
SK	Queratosis seborreica (del inglés, <i>Seborreic Keratoses</i>)
SKS	Síndrome de Smith-Kingsmore
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (del inglés, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SNV	Variación de un nucleótido único (del inglés, <i>Single Nucleotide Variation</i>)
SSC	Síndromes de Sobrecrecimiento
TSC1	Complejo esclerosis tuberosa 1 (del inglés <i>Tuberous sclerosis complex 1</i>)
TSC2	Complejo esclerosis tuberosa 2 (del inglés <i>Tuberous sclerosis complex 2</i>)
VUS	Variante de significado incierto (del inglés, <i>Variant of Uncertain Significance</i>)

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Sobrecrecimiento y anomalías vasculares

Los síndromes de sobrecrecimiento (SSC) son un grupo heterogéneo de enfermedades poco frecuentes en las que la característica principal es la excesiva proliferación de órganos y/o tejidos, ya sea de forma congénita o de aparición postnatal. Los SSC generalizados son aquellos en los que el sobrecrecimiento es extendido, simétrico o asimétrico, y en los que el peso, talla, perímetro cefálico o una combinación de los tres, están por encima del percentil 97 o 2 desviaciones estándar por encima de la media para el sexo, la edad y el grupo poblacional (1-3). Por otro lado, los sobrecrecimientos parciales o segmentarios incluyen aquellas patologías en las que el crecimiento excesivo está confinado a una o varias regiones del cuerpo. En la Tabla 1 se expone una modificación de la clasificación de Weaver (1994) de los SSC, dividiéndolos en generalizados y segmentarios, según la extensión de las estructuras afectadas propuesta por este autor (3).

Tabla 1: Clasificación resumida de los Síndromes de Sobrecrecimiento.

1. Síndromes de sobrecrecimiento generalizados	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bannayan-Riley Rubalcaba ▪ Beckwith-Wiedemann ▪ Cantú ▪ Costello ▪ Displasia epifisaria hemimélica ▪ Elejalde ▪ Enamel-Renal ▪ Esclerosteosis 1 ▪ Fryer ▪ Malan (Sotos tipo 2) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Marshal-Smith ▪ MOMO ▪ Mutaciones en la familia de genes <i>PP2A</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mutaciones en <i>mTOR</i> (Síndrome de Smith-Kingsmore) ▪ Neurofibromatosis tipo I ▪ Perlman ▪ Simpson-Golabi-Behmel ▪ Sotos ▪ Richieri-Costa ▪ Síndrome 15q26 ▪ Síndrome de delección 17q11.2, 1.4-Mb ▪ Síndrome de microdelección 19p13.13 ▪ Sobrecrecimiento no sindrómico (con/sin DI) ▪ Tatton-Brown-Rahman ▪ Tenorio ▪ Weaver
2. Síndromes de sobrecrecimiento segmentario	
A. Espectro de sobrecrecimientos asociados a <i>PIK3CA</i>:	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ CLOVES ▪ Hemihiperplasia lipomatosa múltiple ▪ Hemihipertrofia muscular ▪ Hemimegalencefalia / Megalencefalia displásica ▪ Klippel-Trenaunay 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Macrocefalia-Malformación Capilar ▪ Macrodactilia ▪ Patologías de la piel: nevus epidérmico, queratosis seborreica, queratosis liquenoide benigna ▪ Sobrecrecimiento fibroadiposo / Lipomatosis infiltrativa facial
B. Otros sobrecrecimientos segmentarios	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ CLAPO* ▪ Hipoglicemia hipoinsulinémica con hemihipertrofia ▪ Megalencefalia-polimicrogiria-pollidactilia-hidrocefalia 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Neurofibromatosis Tipo 1 en mosaico ▪ Neurofibromatosis Tipo 2 en mosaico ▪ Proteus

Se han dividido en sobrecrecimientos generalizados y parciales, siguiendo la clasificación propuesta por Weaver (3), y actualizada por el Dr. Tenorio en su tesis doctoral (4). * En febrero de 2018 nuestro grupo describió *PIK3CA* como la causa molecular de CLAPO.

Los SSC suelen ir acompañados de otras características clínicas como pueden ser dismorfia facial, discapacidad intelectual, anomalías congénitas múltiples y un riesgo incrementado de presentar neoplasias (5). Las anomalías vasculares también suelen ser una característica clínica importante y frecuente en un amplio número de SSC. Las malformaciones vasculares, vistas de forma aislada, engloban un grupo heterogéneo de lesiones que, según la Sociedad internacional para el estudio de anomalías vasculares (ISSVA, por sus siglas en inglés), pueden ser capilares, venosas, arteriovenosas, linfáticas o diversas combinaciones de ellas (2). La clasificación de la ISSVA de 2014 (Tabla 2), recientemente actualizada por McCuaig (6), introduce un apartado específico para aquellas malformaciones vasculares asociadas a otras anomalías, como pueden ser los sobrecrecimientos, principalmente de tipo segmentario. De esta forma, queda patente la importante coocurrencia de los sobrecrecimientos y las malformaciones vasculares en diferentes tipos de síndromes.

Una forma de clasificar los SSC asociados a malformaciones vasculares es discriminando según su origen en alteraciones cromosómicas, epigenéticas o génicas. Éstas últimas pueden presentarse de forma tanto germinal/constitutiva (en todas las células del cuerpo) como somática (debido a alteraciones post-cigóticas). Estas alteraciones génicas pueden involucrar a un amplio número de genes diferentes. Sin embargo, en este grupo de patologías se ha visto que las principales alteraciones moleculares se encuentran en genes que pertenecen a la ruta de señalización PI3K/AKT/mTOR.

Tabla 2: Malformaciones vasculares asociadas a sobrecrecimiento según la clasificación de 2014 de la ISSVA.

Malformaciones vasculares asociadas a sobrecrecimiento	
Síndrome de Klippel-Trenaunay	MC + MV +/- ML + Sobrecrecimiento de extremidades
Síndrome de Parkes-Weber	MC + FAV + Sobrecrecimiento de extremidades
Síndrome de Sturge-Weber	MC faciales y leptomeningias + afectación ocular +/- sobrecrecimiento óseo y de tejidos blandos
Macrocefalia-Malformación Capilar	MC facial y corporal + sobrecrecimiento
Síndrome CLOVES	ML + MV + MC +/- MAV + sobrecrecimiento lipomatoso
Síndrome Proteus	MC, MV y/o ML + sobrecrecimiento somático asimétrico
Síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba	MAV + MV + macrocefalia + sobrecrecimiento lipomatoso

Modificado de (7). La primera columna corresponde al nombre del síndrome y la segunda a sus características clínicas. Abreviaturas: MC: Malformación Capilar; MV: Malformación Vascular; ML: Malformación Linfática; MAV: Malformación ArterioVenosa; FAV: Fístula ArterioVenosa.

1.2 Ruta de señalización celular PI3K/AKT/mTOR

Durante el desarrollo embrionario es muy importante la coordinación entre los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular, en los que intervienen numerosos factores y rutas moleculares. Las alteraciones en rutas celulares críticas pueden ser letales en el embrión, o causar una patología (8). Entre este tipo de rutas principales se encuentra la ruta PI3K/AKT/mTOR.

La activación de esta ruta se produce como consecuencia de la unión de un factor de crecimiento a un receptor de tirosina-quinasa, el cual activa a fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K), que fosforila el fosfatidilinositol (4-5)-bifosfato (PIP₂) a fosfatidilinositol (3,4-5)-trifosfato (PIP₃), en una reacción que es antagonizada por la proteína PTEN. Asociado a la membrana, PIP₃ facilita la localización y la fosforilación de PDK1, que activa a AKT mediante fosforilación de su residuo Thr308 (9). Asimismo, AKT es activado por la fosforilación de su Ser742 a través del complejo mTOR (mTOR2). Posteriormente, AKT inhibe el complejo proteico TSC1/TSC2, que a su vez sirve como inhibidor del complejo mTOR1 (8), regulando así procesos de síntesis de proteínas, crecimiento y supervivencia celular (Figura 1), procesos en los cuales la ruta PI3K/AKT/mTOR es fundamental. La activación anormal de esta vía conduce a una respuesta proliferativa y antiapoptótica que se relaciona con el desarrollo de múltiples tipos de cáncer. Por este motivo, su estudio es crucial para el entendimiento de los procesos de carcinogénesis. Algunos ejemplos de cánceres relacionados con alteraciones moleculares en la vía de PI3K/AKT/mTOR son: leucemia mieloide aguda, cáncer de colon, glioblastoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer gástrico, carcinoma pancreático, o cáncer de pulmón (10-15). Además de estar relacionadas con cáncer, las mutaciones en los genes de esta ruta también han sido descritas como causantes de algunos SSC (16, 17): Síndrome Proteus (*AKT1*) (18), Síndrome de Bannayan-Riley Ruvalcaba (*PTEN*) (19), Síndrome de Megalencefalia-polimicrogiria-polidactilia-hidrocefalia (*AKT3* y *PIK3R2*) (20), Espectro de sobrecrecimientos asociados a *PIK3CA* (PROS; *PIK3CA*) (20), Síndrome de Smith-Kingsmore (*mTOR*) (21, 22), hemihiperplasia asociada a hipoglucemia (*AKT2*) (23), y síndrome de Tenorio (*RNF125*) (24), entre otros. En el caso del espectro PROS, en el que se incluyen varios síndromes asociados a sobrecrecimiento y malformaciones vasculares con características clínicas solapantes, las mutaciones en *PIK3CA* ocurren como un evento post-cigótico, causando mosaicismo somático, por lo que el espectro fenotípico dentro de este grupo varía en severidad y localización dependiendo del momento del desarrollo embrionario en el cual la mutación tiene lugar.

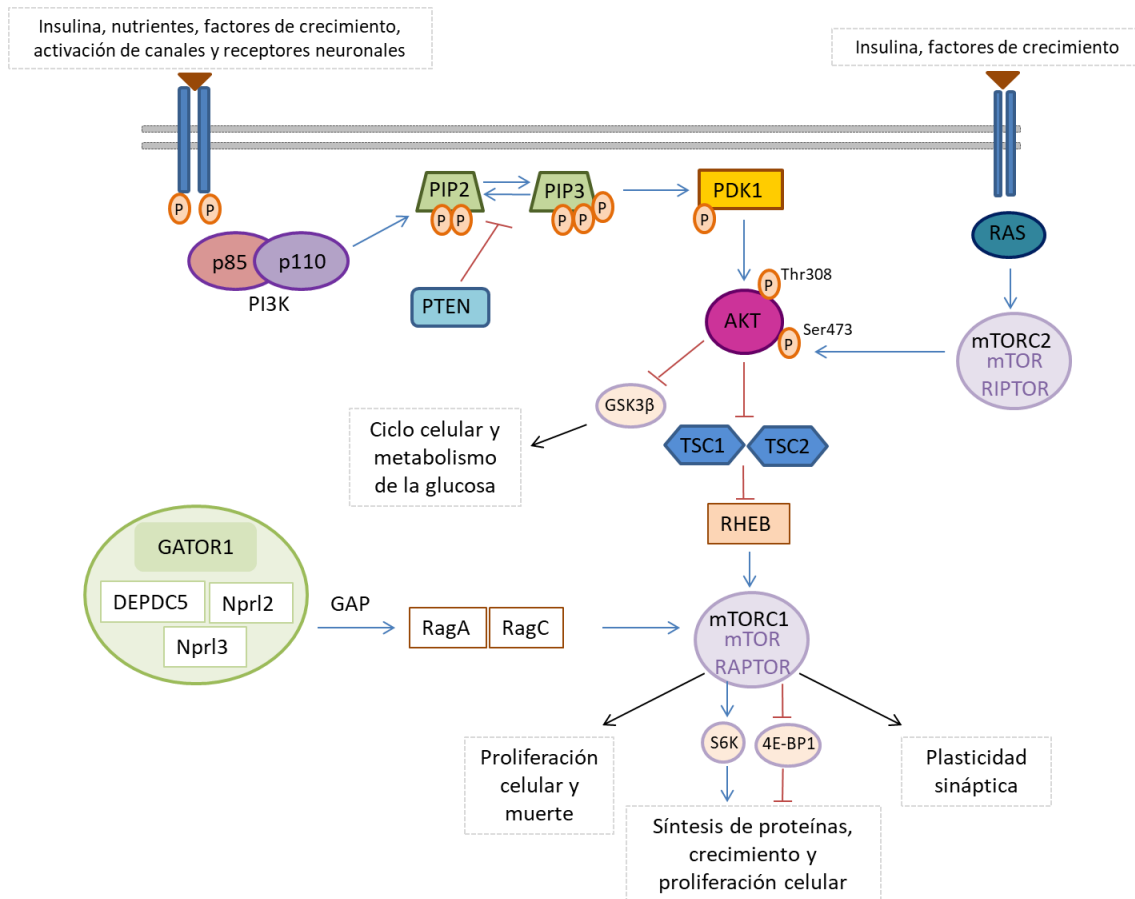


Figura 1: Ruta de señalización celular PI3K/AKT/mTOR. Las flechas azules significan activación, mientras que las rojas significan inhibición. Modificado de (22).

1.3 *PIK3CA*

PIK3CA (MIM# 171834) son las siglas correspondientes a “*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*”. Como bien indica su nombre, *PIK3CA* (localizado en el cromosoma 3q26.32) codifica la subunidad catalítica p110 α de PI3K α , una quinasa lipídica heterodimérica localizada principalmente en la membrana plasmática, que interviene en la comunicación celular y transducción de señales, y que consta además de una subunidad reguladora p85 α , codificada por el gen *PIK3R1*. La subunidad p110 α está compuesta por cinco dominios: un dominio de unión-adaptador (ABD), un dominio de unión a Ras (RBD), un dominio C2, un dominio helicoidal y un dominio quinasa (25, 26). Las primeras mutaciones identificadas en el gen *PIK3CA*, en su mayoría (~75%) localizadas en el dominio quinasa, estaban relacionadas con cáncer (27). La alta prevalencia de mutaciones en *PIK3CA* en cánceres tan diversos como el colorrectal, de mama, gástrico o carcinomas hepatocelulares convierte a este gen en el oncogén humano más frecuentemente mutado (17, 26). Aunque se han descrito más de 100 variantes diferentes en *PIK3CA* en diversos tipos de cáncer (28), las

mutaciones más comunes o “*hotspots*” son las variantes p.Glu542Lys, p.Glu545Lys e p.His1047Arg. Los estudios funcionales han demostrado que las variantes en estos *hotspots* incrementan la actividad quinasa lipídica de PI3K α en comparación con la proteína nativa (mutaciones de ganancia de función: *gain of function* (GOF)), y por lo tanto estimulan el crecimiento (26, 29, 30).

A pesar de la conocida implicación del gen *PIK3CA* en cáncer, no fue hasta el año 2012 cuando fue descrita su implicación en SSC segmentarios, en lo que posteriormente se ha denominado como el espectro PROS (*PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum*) (20, 31-33). Hasta el momento, en el gen *PIK3CA* han sido identificadas 55 variantes diferentes causantes del espectro PROS, siendo igual de prevalentes los mismos *hotspots* que aparecen en los casos de cáncer. Las mutaciones en *PIK3CA* asociadas a sobrecrecimiento segmentario son *de novo* y se producen en forma de mosaicismo somático, es decir, como un evento post-cigótico. Este mecanismo tiene implicaciones tanto en el asesoramiento genético de los individuos afectados (dependiendo de si hay afectación o no de la línea germinal), como en la elección de la metodología adecuada para el diagnóstico molecular. Las variantes patogénicas en PROS se encuentran en la mayoría de los casos únicamente en los tejidos afectados (34) y con frecuencia en forma de mosaicos bajos, por lo que las técnicas clásicas de detección de variantes (secuenciación Sanger) a partir de ADN constitutivo (sangre periférica) no son eficaces. Por ello, el diagnóstico molecular se debe realizar, en la mayoría de los casos, en muestras de tejido afecto, y mediante técnicas de secuenciación de alto rendimiento, como la secuenciación masiva, que permitan además la detección de variantes que se presentan como mosaicos bajos (35). Por otro lado, el estudio de *PIK3CA* tiene una complejidad añadida, ya que sus exones 10 al 14 comparten un 95% de homología con otra región del genoma localizada en el cromosoma 22 (36), con lo que para el análisis de dicha región se debe comprobar que realmente se está estudiando el gen *PIK3CA* y no la región homóloga del genoma.

1.4 Mosaicismo somático

El mosaicismo somático (Figura 2) se define como la presencia en un mismo individuo de dos o más poblaciones celulares genéticamente diferentes, todas ellas derivadas de una única célula (35). El mosaicismo puede ser causado por mutaciones en el ADN, alteraciones epigenéticas, anomalías cromosómicas y reversiones espontáneas de mutaciones heredadas (37). Según la base genética sobre la que se origina, el mosaicismo somático puede clasificarse como tipo I o tipo II (38). El mosaicismo de tipo I es causado por mutaciones post-cigóticas en heterocigosis, generando lesiones segmentarias simples o múltiples, mientras que el tipo II se

origina por una alteración post-cigótica que aparece sobre una alteración no segmentaria previa (39), de forma que la afectación segmentaria es mucho más pronunciada, y su aparición puede preceder a la aparición de lesiones diseminadas del mismo fenotipo por meses o años. (38-40). La hemimegalencefalia (el incremento de tamaño asimétrico de un hemisferio cerebral) sería un ejemplo de mosaicismo tipo I (31, 40, 41), mientras que los neurofibromas plexiformes que aparecen en pacientes con Neurofibromatosis tipo I serían un ejemplo de mosaicismo de tipo II (39).

Dependiendo del estadio durante el desarrollo embrionario en el que tenga lugar la mutación, y el número y tipo de células que afecte, el fenotipo clínico resultante será más o menos extenso (42, 43). En términos teóricos, las mutaciones que ocurren durante la primera división mitótica, darán lugar a individuos con aproximadamente la mitad de las células afectadas (44). Aunque el mosaicismo más evidente y fácil de estudiar es el que tiene lugar en la piel (45), no es el único, y cualquier otro órgano del cuerpo puede verse afectado. Fenotípicamente, el mosaicismo somático puede manifestarse como alteraciones epiteliales simples, diseminadas o parcheadas, o puede seguir patrones segmentarios derivados del desarrollo embrionario, como ocurre con los patrones asociados a las líneas epiteliales de Blaschko, la distribución tipo tablero de ajedrez, la distribución filoide o la distribución parcheada sin separación de la línea media del cuerpo (Figura 2) (46).

Según el tipo de tejido afectado, el mosaicismo puede también clasificarse como puramente somático (si no involucra a las células de la línea germinal), gonadal (si está únicamente en las células germinales que dan origen a los óvulos o espermatozoides), o una combinación de ambos, a lo que se ha denominado como mosaicismo gonosomal (Figura 2). Cuando un tipo de mutación específica sólo es detectada en forma de mosaicismo somático, como ocurre con la mayoría de variantes de ganancia de función en el gen *PIK3CA*, se asume que en general su estado heterocigoto constitutivo (en todas las células del individuo) no es compatible con la vida. Por ello, aunque en casos de mosaicismo gonadal o gonosomal, el riesgo teórico de transmisión a la descendencia es del 50%, en la práctica estos embarazos por regla general no son viables y por lo tanto las mutaciones no son transmisibles (47). La única excepción es cuando la dirección del cambio es la contraria, es decir, cuando se produce un mosaicismo por recuperación de una mutación constitutiva, un mecanismo poco conocido y actualmente más asociado a patologías dermatológicas en las que se detectan clones de piel normal en individuos con afectación generalizada causada por mutaciones germinales, que se conoce como mosaicismo de reversión (43, 48).

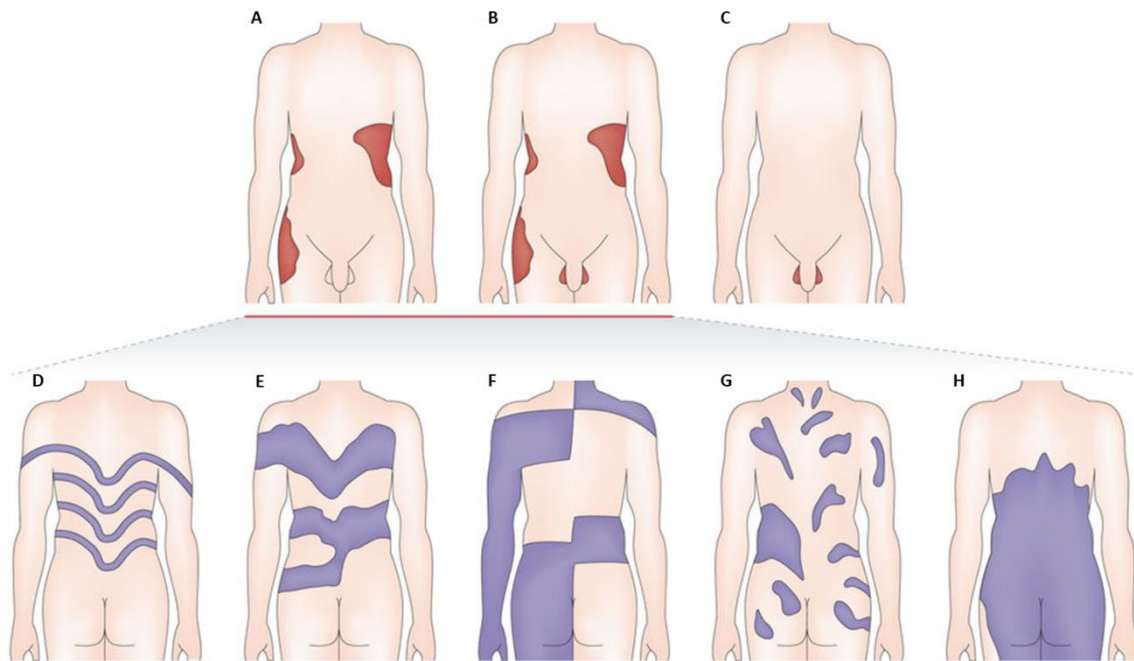


Figura 2: Representación esquemática del mosaicismo y patrones de mosaicismo cutáneo. El mosaicismo puede ser: puramente somático (A), gonosomal (B) y gonadal (C). Existen patrones de mosaicismo somático en relación al modo de presentación en la piel: las líneas de Blaschko estrechas (D) y anchas (E), la distribución tipo tablero de ajedrez (F), la distribución filioide (G) o la distribución parcheada sin separación de la línea media (H). Modificado de Biesecker y Spinner 2013 (47).

1.4.1 Detección de mosaicismo somático

El estudio de las variantes en mosaico es complejo, por lo que es necesario el uso de técnicas que permitan detectar porcentajes muy bajos de células portadoras de una variante. La presencia de bajos porcentajes de variantes en el ADN puede deberse, entre otras cosas, a la forma de obtención de las muestras de estudio. En el mosaicismo somático, el tipo de muestra a analizar debe ser “tejido afecto”, algo que no siempre es fácil de definir clínicamente. Sin embargo, su obtención supone una intervención agresiva (normalmente biopsia), no siempre necesaria dentro del tratamiento rutinario del paciente. Por otro lado, en la mayoría de los casos las células afectadas no se corresponden con el total de las células que integran el tejido en estudio, e incluso pueden representar un porcentaje muy bajo, difícilmente detectable sin la tecnología adecuada (43). Por este motivo, las técnicas tradicionales como la secuenciación Sanger, no son buenas para la detección de este tipo de variantes que se presentan en mosaicos bajos, ya no sólo por el rango de detección, que debe ser superior al 20% en la secuenciación Sanger, sino porque no permite el estudio de múltiples genes en un solo experimento en aquellos casos en los que el diagnóstico clínico sea dudoso o no definitivo (49, 50).

La aparición de la técnica de secuenciación masiva hace ya más de una década, ha revolucionado el estudio de la genética humana. Esta técnica (también llamada “*Next Generation Sequencing*” -NGS-, o “*massive parallel sequencing*”), a diferencia de la secuenciación Sanger, se caracteriza por ser capaz de leer un gran número de secuencias de ADN en una única reacción, y poder mostrar los cambios genotípicos molécula a molécula (51). Asimismo, permite obtener un gran número de lecturas de cada base/nucleótido del ADN estudiado, lo que permite calcular con una mayor fiabilidad el porcentaje de mosaicismo de una muestra/tejido estudiado. Este hecho es el que convierte esta técnica en la mejor opción para la detección de variantes en mosaico.

En un experimento típico de NGS el ADN de interés es extraído, fragmentado, seleccionado y secuenciado hasta producir un gran número de lecturas. Esta información, con sus respectivos parámetros de calidad, es utilizada para alinear las lecturas obtenidas con la secuencia del genoma de referencia. Las diferencias de nucleótidos encontradas entre las lecturas obtenidas y la secuencia de referencia son anotadas como variantes. Además, el número de lecturas alineadas contra regiones concretas del genoma puede utilizarse para inferir cambios en el número de copias (43). Aunque debido a deficiencias técnicas y bioinformáticas, actualmente las grandes deleciones y duplicaciones genómicas se pueden ver con una mejor resolución mediante otras técnicas como los microarrays-CGH o de SNPs, la NGS cada vez más permite estudiar de forma fiable este tipo de alteraciones en el diagnóstico asistencial de rutina.

En el caso de las variantes en mosaico, además de su identificación, es importante la cuantificación teórica del número de células afectadas, mediante el cálculo del número de lecturas que presenta la variante (alelo alternativo), pues nos ayudará a saber más acerca de la extensión de la variante, así como hacer inferencias sobre el momento durante el desarrollo embrionario en el cual se produjo dicha mutación (43).

Además de la NGS, existen otras técnicas capaces de detectar variantes específicas en mosaico, como son la pirosecuenciación y la *droplet digital PCR* (ddPCR). La pirosecuenciación es una técnica de genotipado basada en la síntesis “*de novo*” a tiempo real (52-54), que nos permite monitorizar de forma cuantitativa la incorporación de nucleótidos a través de la conversión enzimática de un pirofosfato liberado en una señal luminosa proporcional (55). En la figura 3, se representa cómo el pirofosfato liberado (PPi) tras la incorporación de cada nucleótido es utilizado por la enzima sulfúrilasa, produciendo ATP, que a su vez es utilizado por una luciferasa en la conversión de luciferina en oxiluciferina, produciendo así un pico de luz que es medido y reflejado en el pirograma resultante. La altura del pico varía en función del número de nucleótidos iguales que se incorporan de manera consecutiva. Cuando un

nucleótido no es incorporado en la reacción, no se libera pirofosfato, y una apirasa lo degrada (56, 57).

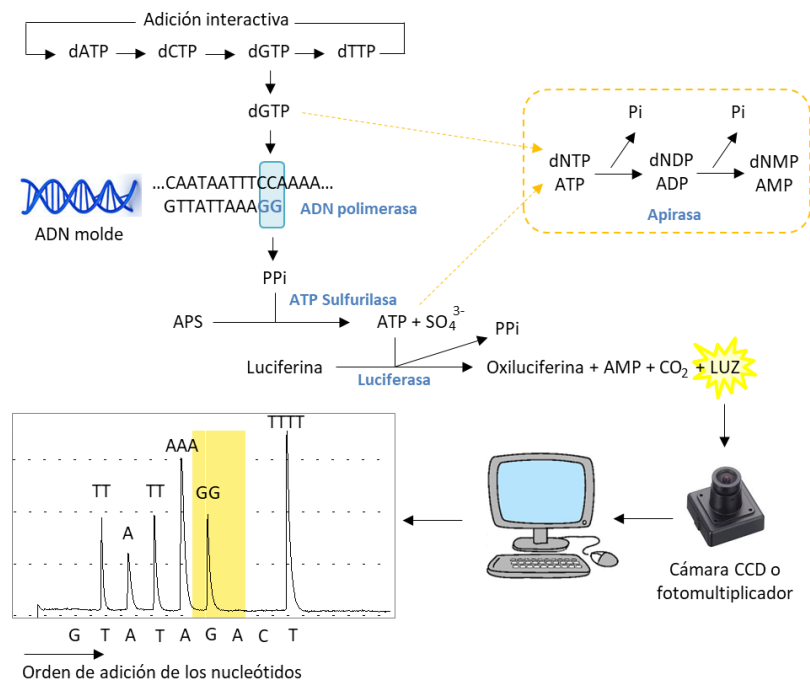


Figura 3: Esquema del proceso de pirosecuenciación. En azul aparecen las enzimas que intervienen a lo largo del proceso.

Otra técnica desarrollada más recientemente, es la ddPCR, que es capaz de hacer la cuantificación absoluta de ácidos nucleicos en una muestra (58). Esta técnica es utilizada para la cuantificación absoluta de alelos, para la detección de variantes en mosaicos bajos, para el análisis de variaciones en el número de copias, para detectar y cuantificar el grado de metilación en una secuencia de ADN y para la detección de pequeñas cantidades de ADN fetal (59, 60) en una muestra de sangre materna (61), todo ello con una cantidad inicial de ADN muy baja. Debido a su gran sensibilidad y exactitud, es una técnica muy útil en el estudio de las variantes específicas en muestras de tejido afecto, y muestras en las que la cantidad y calidad del ADN obtenido no siempre son las deseables (62). Sin embargo, no se puede emplear como técnica de rastreo de variantes, ya que únicamente permite analizar una posición genómica por experimento. Como se muestra en la figura 4, la ddPCR se basa en la generación de miles de gotas (63) en las cuales se produce una amplificación individual, que después será cuantificada, discriminando entre alelos mutados y alelos de referencia mediante el uso de sondas TaqMan.

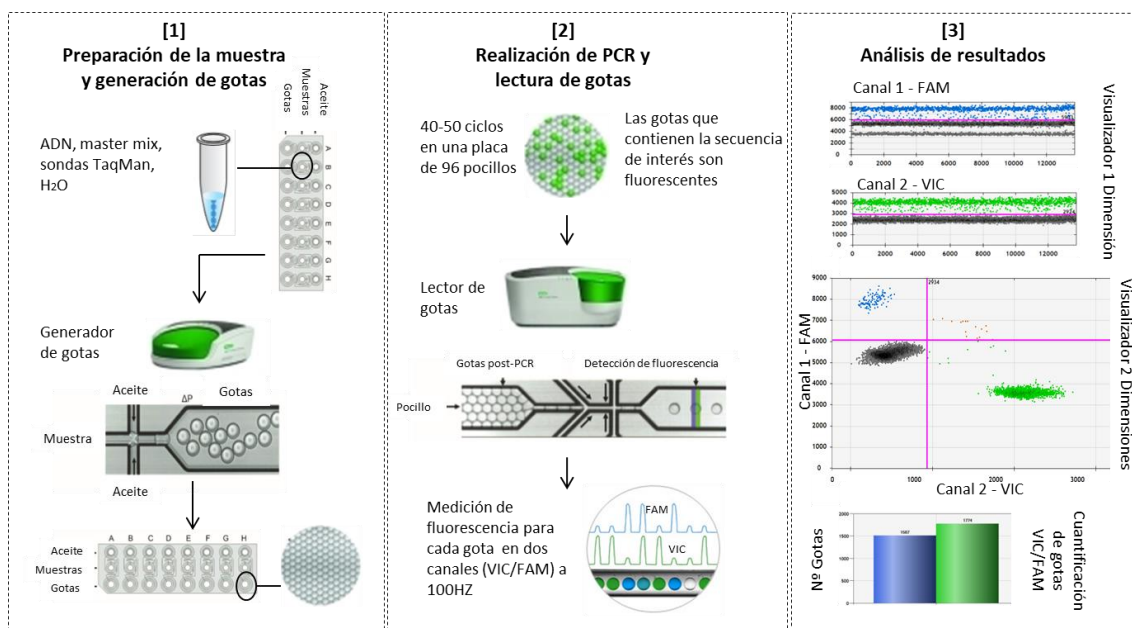


Figura 4: Esquema representativo de los pasos para realizar *droplet digital PCR*. Consiste en un primer paso de preparación de la muestra (ADN + master mix + sondas TaqMan específicas para cada variante + agua destilada) y generación de gotas gracias a la utilización de un aceite específico y un aparato diseñado para ello; un segundo paso de realización de PCR a una temperatura específica para cada sonda y lectura de las gotas mediante la medición de la fluorescencia en dos canales diferentes (VIC para la secuencia nativa y FAM para la secuencia mutada); y por último un tercer paso de análisis de resultados visualizando los canales por separado (en una dimensión) o en conjunto (visualizador de dos dimensiones), así como cuantificando las gotas que tienen incluido FAM o VIC en su interior.

1.5 Espectro de sobrecrecimientos asociados a *PIK3CA*

El espectro de sobrecrecimientos asociados a *PIK3CA*, también conocido como PROS, incluye un amplio grupo de patologías, originalmente consideradas como entidades diferenciadas, pero que actualmente se agrupan bajo la misma denominación. La decisión de agrupar un amplio número de entidades que a priori son clínicamente distintas, aunque compartan cierto solapamiento fenotípico, fue el hecho de que todas ellas son causadas por mutaciones somáticas de ganancia de función en el gen *PIK3CA* (42). Este mecanismo, el mosaicismo somático (Figura 2), explicaría la clínica tan variable que se puede encontrar en PROS. Como se puede observar en la tabla 3, el espectro PROS se puede dividir en A) fenotipos sindrómicos, complejos y con un alto grado de afectación, como son el Síndrome de Macrocefalia-Malformación Capilar (MCAP – MIM #602501), el Síndrome CLOVES (MIM #612918) o el sobrecrecimiento fibroadiposo (FAO) y B) fenotipos aislados y compromiso menos extenso como la macrodactilia (MIM #155500) o las malformaciones linfáticas aisladas. Clínicamente, PROS se caracteriza por un sobrecrecimiento congénito o de aparición temprana en la infancia, de aparición esporádica (sin historia familiar) y distribución en mosaico. Estas tres características son necesarias para hacer un primer diagnóstico clínico de PROS. Aunque

muchos de los pacientes muestran progresión de la enfermedad, no es una característica ineludible, y hay pacientes con características aisladas (42, 64, 65).

Tabla 3: Espectro de sobrecrecimientos asociados a *PIK3CA* (PROS).

Tipo de PROS	Principales características clínicas
Sindrómicos: con afectación de múltiples órganos	
Macrocefalia-Malformación Capilar	Megalencefalia o hemimegalencefalia, polimicrogria, herniación de las amígdalas cerebelosas, ventriculomegalia, malformaciones vasculares (típicas en la línea media facial), sobrecrecimiento segmentario, sindactilia, polidactilia, alteraciones del tejido conectivo. (66)
CLOVES	Sobrecrecimiento lipomatoso en tronco y extremidades, malformaciones vasculares y linfáticas, anomalías esqueléticas como escoliosis y nevi epidérmicos. (67, 68)
Klippel–Trenaunay*	Varias combinaciones de malformaciones capilares, venosas y linfáticas asociadas con sobrecrecimiento de extremidades. (69-71)
Hemihiperplasia múltiple lipomatosa	Asimetría moderada y sobrecrecimiento con múltiples lipomas (72).
Sobrecrecimiento fibroadiposo	Sobrecrecimiento progresivo de tejido fibroadiposo subcutáneo, muscular y visceral junto con sobrecrecimiento esquelético. Pueden presentar también malformaciones vasculares cutáneas (8, 32).
Lipomatosis infiltrativa facial	Sobrecrecimiento hemifacial con infiltración de tejidos blandos, hipertrofia ósea, macrodontia, hemimacroglosia, erupción prematura de los dientes y neuromas mucosos (73, 74).
Anomalías vasculares fibroadiposas	Infiltración fibroadiposa del músculo, flebectasia inusual con dolor, y contractura de la extremidad afectada (8, 75).
Características aisladas: específicas de tejido	
Macroactilia	Sobrecrecimiento de uno o varios dedos. (33, 42).
Hemihiperplasia muscular	Sobrecrecimiento muscular localizado y no progresivo (76).
Malformaciones linfáticas aisladas	Canales linfáticos dilatados o quísticos en cualquier localización (8, 75, 77).
Hemimegalencefalia, megalencefalia displástica, displasia cortical focal tipo IIa	Malformaciones de la corteza cerebral normalmente asociadas a epilepsias (8, 40, 78)
Patologías de la piel: Nevus epidérmico, Queratosis seborreica	Lesiones epiteliales benignas causadas por un crecimiento excesivo de células en la capa más externa de la piel (79).
Queratosis liquenoide benigna	Lesiones cutáneas solitarias y benignas, en forma de pápula o placa marrón o rojiza (8, 80).

Clasificación en sindrómicos o aislados, y resumen de sus características principales. Modificado de (8). *En el año 2015, KTS fue propuesto para incluirse en el espectro PROS (81) por identificarse variantes en *PIK3CA* en un grupo de pacientes con este diagnóstico (9, 75); sin embargo, en la actualidad aún existe cierta controversia entre incluir este síndrome en el espectro o no.

La primera descripción de variantes de ganancia de función en el gen *PIK3CA* como causantes de las patologías de lo que ahora conocemos como PROS, se hizo en tres artículos publicados en el mismo número de la revista *Nature Genetics* en el año 2012. En uno de estos trabajos Rivière y colaboradores identificaron 15 variantes en el gen *PIK3CA* en 23 pacientes con MCAP, en su mayoría post-cigóticas (87%, 20/23) (20). Otro de los estudios describía seis pacientes con diagnóstico clínico de CLOVES, y variantes en *PIK3CA* en tejido afecto, cuyo porcentaje de mosaicismo, calculado por el número de lecturas obtenidas al realizar NGS variaba desde 3 a 30% (9). El tercer artículo, describía la detección, en muestras de tejido afecto, de variantes en *PIK3CA* como causantes de Macroductilia en cinco pacientes (33).

A partir de estas primeras publicaciones, el número de patologías sindrómicas o manifestaciones aisladas asociadas a mutaciones somáticas en el gen *PIK3CA* fue aumentando rápidamente. La disparidad fenotípica, explicada por el mecanismo del mosaicismo somático, hizo entonces necesario realizar una revisión completa de las características clínicas y criterios diagnósticos del espectro PROS. Por ello, en el año 2015 se estableció un protocolo de diagnóstico (Tabla 4) cuyos criterios dependen de si la afectación clínica es de tipo sindrómica (categoría A) o se trata de características aisladas (categoría B). De esta forma, se establecieron recomendaciones que han permitido armonizar los criterios y métodos para realizar el diagnóstico molecular de este diverso grupo de patologías. También permitió agrupar todas las entidades descritas en la tabla 3, resaltando el hecho de que se trata de un espectro continuo en el que en ocasiones no se puede distinguir entre unas entidades y otras debido al solapamiento fenotípico (Figura 5) (42).

Cada uno de los síndromes por separado dentro del espectro PROS es poco frecuente, menos de 5 casos por cada 10.000 habitantes por lo que cumplen la definición canónica de enfermedad rara que establece la Unión Europea, y por lo tanto no tiene frecuencia o prevalencia estimada y se hace referencia a ellos en términos de número de casos descritos (82).

Tabla 4: Criterios establecidos para el diagnóstico de pacientes del espectro de sobrecrecimientos asociados a *PIK3CA*. Modificado de (42).

Criterios diagnósticos en PROS	
Requerido:	
<ul style="list-style-type: none"> Presencia de mutación somática en <i>PIK3CA</i> (si no se detecta mutación, considerar como diagnóstico presuntivo de PROS). Sobrecrecimiento congénito o de inicio temprano en la infancia Distribución en mosaico Esporádico (sin historia familiar) 	
Otras características según categoría:	
A. Formas sindrómicas: (requerido dos o más características)	
<ul style="list-style-type: none"> Sobrecrecimiento: adiposo, muscular, nervioso y/o esquelético Malformaciones vasculares: capilares, venosas, arteriovenosas y/o linfáticas Nevus epidérmico 	
B. Formas aisladas	
<ul style="list-style-type: none"> Malformaciones linfáticas aisladas Macroductilia aislada o sobrecrecimiento en manos/pies, o extremidades. Sobrecrecimiento adiposo en tronco Hemimegalencefalia (bilateral) / Megalencefalia displásica / Displasia cortical focal Nevus epidérmico Queratosis seborreica Queratosis benigna liquenoide 	

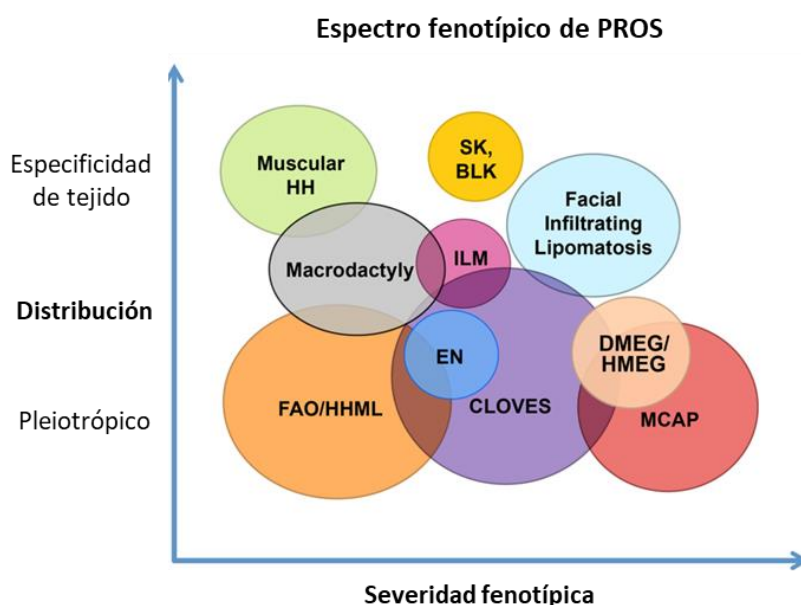


Figura 5: Espectro fenotípico de los sobrecrecimientos asociados a *PIK3CA*. Se trata de un espectro continuo, en el que la severidad fenotípica así como la especificidad de tejido varían en función del momento en el cual se produce la mutación durante el desarrollo embrionario. Modificado de Kepplel-Noreuil et al. 2014. (42). Abreviaturas: BLK: Queratosis liquenoide benigna; CLOVES: Síndrome CLOVES; DMEG: megalencefalia displásica; EN: Nevus epidérmico; FAO: Sobrecrecimiento fibroadiposo; Muscular HH: Hemihiperplasia muscular; HHML: Hemihiperplasia múltiple lipomatosa; HMEG: Hemimegalencefalia; ILM: Malformaciones linfáticas aisladas; MCAP: Macrocefalia-Malformación Capilar; SK: Queratosis seborreica.

Esta Tesis Doctoral se centra principalmente en el estudio de pacientes con un diagnóstico clínico previo de Macrocefalia-malformación Capilar, CLOVES, macrodactilia y pacientes con características clínicas solapantes y fenotipo clínico no bien definido, así como un grupo reducido de pacientes con diagnóstico clínico de DCMO, por lo que a continuación describiremos específicamente estas patologías.

1.5.1 Macrocefalia-Malformación Capilar

La primera descripción de este síndrome se hizo en el año 1997 con el nombre de Síndrome de Macrocefalia-Cutis Marmorata Telangiectasia Congénita (83, 84). En el año 2007 Toriello y Mulliken (85) lo renombraron como Macrocefalia-Malformación Capilar (M-CM), debido a que la cutis marmorata telangiectasia congénita descrita originalmente en estos pacientes es en realidad una malformación capilar reticulada extensa (86, 87). Asimismo, en 2012 Mirzaa y sus colaboradores propusieron acuñar el término Megalencefalia-Malformación Capilar (MCAP) ya que la macrocefalia es una consecuencia del sobrecrecimiento, simétrico o asimétrico, de los hemisferios cerebrales (88). Actualmente, este síndrome está incluido dentro del espectro PROS, y aunque en la literatura es más común ver el término MCAP propuesto por Mirzaa (42, 72, 89), el término M-MC continúa utilizándose (90).

Las características clínicas más comunes de este síndrome, presentes en más del 75% de los casos descritos, son: macrocefalia (96%), malformaciones capilares (97%), asimetría de la cabeza, el cuerpo o la cara (86%), sobrecrecimiento congénito (77%), malformación capilar en la línea media facial (glabella, filtrum/surco nasolabial y labio superior) (77%), y alteraciones de neuroimagen (85%), entre las que destacan la ventriculomegalia (76%), cavum septum pellucidum o cavum septum vergae (71%), herniación de las amígdalas cerebelosas (69%), y asimetría cerebral o del cerebelo (53%). De forma también frecuente, en un 25-75% de los pacientes, se puede observar retraso en el desarrollo (65%), sindactilia o polidactilia (63%), hipotonía neonatal (68%), frente prominente (59%), anomalías del tejido conectivo (como hiperlaxitud o hipermovilidad articular) (58%), hidrocefalia (50%) y/o hemimegalencefalia (31%) (Figura 6). Otras características menos frecuentes (<25%) son la epilepsia, el hipertelorismo o la hernia umbilical (66, 85, 91).



Figura 6: Principales características clínicas en pacientes con diagnóstico de Macrocefalia-Malformación Capilar: macrocefalia y frente prominente (A), malformaciones capilares en línea media facial (B) y cuerpo (C), hemimegalencefalia (D), sindactilia (E).

Algunas de las manifestaciones clínicas presentes en MCAP, son también características de otros síndromes, como es el caso de las malformaciones vasculares reticuladas y extensas o el sobrecrecimiento asimétrico, que también forman parte de los criterios diagnósticos para el síndrome de Klippel-Trenaunay. En el caso de la malformación capilar en el labio (figura 6B), en MCAP es característica su presencia en el labio superior, extendiéndose por filtrum y glabella. Sin embargo, en otro SSC segmentario de características solapantes, llamado Síndrome CLAPO (*Capillary malformation of the lower lip, Lymphatic malformation predominant on the face and neck, Asymmetry, and Partial/generalized Overgrowth*) (92), una de las principales características clínicas es la presencia de la malformación capilar en labio inferior. Anatómicamente, la afectación diferencial del labio inferior o el labio superior es distintiva y es relevante ya que tienen orígenes embriológicos e implicaciones clínicas distintas, poniendo además en evidencia cómo se originan los patrones de afectación de los mosaicismos somáticos a través de la afectación de diferentes estructuras embriológicas. Actualmente, se sabe que CLAPO también está causado por mutaciones de ganancia de función en el gen *PIK3CA* (93).

1.5.2 Síndrome CLOVES

El síndrome CLOVES (*Congenital Lipomatous Overgrowth with Vascular, Epidermal and Skeletal abnormalities*) (67) fue descrito por primera vez en 2007 por Sapp y col. en siete pacientes con manifestaciones clínicas similares al Síndrome Proteus, pero que no cumplían estrictamente los criterios para ese diagnóstico (94), aunque sí tenían algunas características solapantes como son la asimetría, las malformaciones vasculares y los nevi epidérmicos (94). El síndrome CLOVES se caracteriza por hemihipertrofia y crecimiento de grandes masas lipomatosas principalmente en tronco y espalda (aunque también en extremidades), asociado a anomalías vasculares (malformaciones vasculares, linfáticas y/o venosas, siendo más frecuente la combinación de linfáticas y venosas) especialmente en tronco, y alteraciones del esqueleto con diferentes grados de escoliosis y alargamiento de las estructuras óseas pero sin distorsión ni progresión. Asimismo, es común la presencia de macrodactilia, manos y/o pies grandes, *sandal gap* (separación entre los dedos primero y segundo de los pies) y asimetría en las extremidades (Figura 7). En la primera descripción del síndrome, el término utilizado fue CLOVE, y posteriormente se añadiría la S final para resaltar la importancia de la escoliosis y otras anomalías esqueléticas (68). Las anomalías viscerales como la hipoplasia o agenesia renal también son frecuentes, y puede haber riesgo de desarrollo de tumores de Wilms. Otro rasgo típico en pacientes con CLOVES es la aparición de nevus epidérmico lineal (9, 67, 72, 94, 95). También se asocia en algunos casos con anomalías del sistema nervioso central (68, 72, 94).



Figura 7: Características clínicas principales en pacientes con Síndrome CLOVES: hemihipertrofia y asimetría de extremidades (A, B, C, H), crecimiento de masas lipomatosas (C), anomalías vasculares (A, F), macrodactilia (D, E), sandal gap (A, H), manos y pies grandes (A, D, G, H).

El diagnóstico diferencial en CLOVES, además del mencionado Síndrome Proteus (causado por mutaciones somáticas en el gen *AKT1*, que también incrementan la actividad de la ruta molecular PI3K/AKT/mTOR), debe incluir también al Síndrome de Klippel-Trenaunay, que se caracteriza por malformaciones vasculares asociadas a hipertrofia esquelética y de tejidos blandos en uno o más miembros.

1.5.3 Macroductilia

La macroductilia es una anomalía en la que hay un incremento de tamaño de todas las estructuras de los dígitos (96-98), incluyendo tejidos blandos, hueso, nervios y piel (99), y puede presentarse tanto en las manos como en los pies (Figura 8) (97, 98, 100, 101). En su forma aislada, se trata de una anomalía congénita rara que ocurre en aproximadamente 1 de cada 100.000 nacimientos (33, 99), y de la que existen casos descritos de hace más de 100 años (102). Además de su presentación aislada, puede encontrarse como parte de un síndrome, algo frecuente en CLOVES o Proteus (100, 103). Esta patología puede influir gravemente en la función y apariencia de las extremidades; cuando esto ocurre, la resección quirúrgica es considerada la primera opción en el tratamiento (104).



Figura 8: Macroductilia en pies (A, B, C) y manos (D), en pacientes antes de ser intervenidos quirúrgicamente (A, D) y después de una intervención (B, C).

1.5.4 Malformaciones capilares difusas con sobrecrecimiento: DCMO

DCMO son las siglas correspondientes en inglés a *Diffuse capillary malformation with overgrowth*, o lo que es lo mismo, Malformaciones capilares difusas asociadas a sobrecrecimiento. Este término fue propuesto en el año 2013 para englobar a todos aquellos pacientes con malformaciones capilares difusas que no cumplían los criterios diagnósticos para ser incluidos dentro de síndromes como KTS o MCAP (105). El solapamiento fenotípico que existe entre esta patología y otras incluidas en el espectro PROS es evidente, por ello, aunque su causa molecular aún se desconoce, se decidió incluir pacientes con esta patología en esta tesis doctoral para su estudio.

En pacientes con DCMO, las malformaciones capilares están presentes al nacimiento, y la extensión de las mismas es debido al crecimiento del paciente. Aproximadamente la mitad de los pacientes presentan malformación capilar reticulada y/o malformación capilar facial. También se puede observar, una marcada línea media para la malformación capilar en abdomen y pecho, pero nunca en la espalda (Figura 9). Aparte de las malformaciones vasculares, es muy común el sobrecrecimiento de tejidos blandos y huesos, y la mayoría de los pacientes tiene únicamente sobrecrecimiento en una extremidad (Figura 9B). Asimismo, también se ha relacionado la presencia de hemihipertrofia con una mayor extensión de la malformación capilar en estos pacientes (105). Por otro lado, aunque los síndromes con hemihipertrofia están más relacionados con el desarrollo de tumores de Wilms, no es el caso en pacientes con DCMO (90).

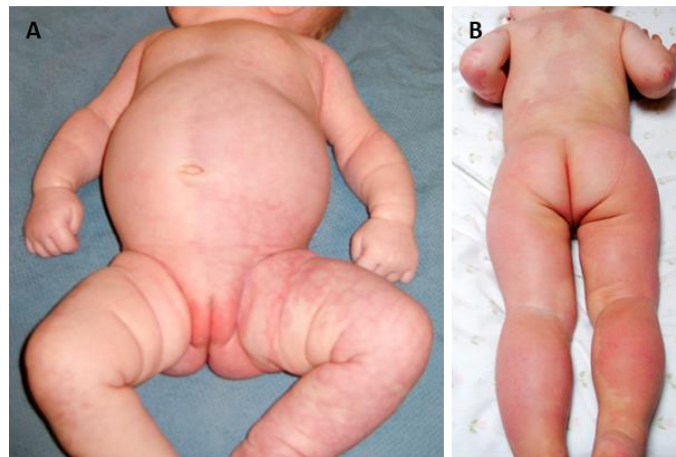


Figura 9: Características clínicas principales en pacientes con DCMO: (A) marcada línea media de la malformación capilar reticulada en abdomen y pecho, pero no en espalda (B). En B se puede observar también cómo el paciente presenta sobrecrecimiento en el lado del cuerpo (pierna izquierda) opuesto a donde las malformaciones capilares son más prominentes (pierna derecha). Modificado de (105).

Aunque MCAP y DCMO comparten muchas características, como son asimetría facial o sobrecrecimiento de extremidades, MCAP puede distinguirse por la hipotonía neonatal o el retraso en el desarrollo, entre otras cosas. En el caso de los síndromes CLOVES y Proteus, puede distinguirse debido a que el sobrecrecimiento en estos es desproporcionado, mientras que en DCMO la hipertrofia es proporcionada. Además, los pacientes con DCMO no presentan las complejas malformaciones vasculares típicas de CLOVES, ni tampoco la escoliosis (105).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

1. El espectro fenotípico de los pacientes con sobrecrecimiento y malformaciones vasculares asociados al gen *PIK3CA* está mal definido, existiendo un gran solapamiento clínico y genético entre los pacientes con características de estas entidades.
2. Debido a la situación de mosaicismo somático de estas enfermedades, el abordaje analítico y los protocolos diagnósticos tanto experimentales como de análisis bioinformático no están correctamente estandarizados.

Objetivos

1. Expansión del fenotipo y genotipo: Evaluar clínica y molecularmente una cohorte de pacientes con diagnóstico clínico de Macrocefalia-Malformación Capilar, Síndrome CLOVES, macrodactilia aislada, y otros con características clínicas solapantes y fenotipo clínico no bien definido, así como una serie de pacientes con DCMO, una entidad clínica, de causa desconocida y con características similares al espectro PROS. Todo ello, con el objetivo de expandir el espectro fenotípico y genotípico de los síndromes de sobrecrecimiento asociados a *PIK3CA*.
2. Desarrollo tecnológico: Desarrollar un protocolo experimental y bioinformático de secuenciación masiva, confiable y aplicable a la práctica clínica, para el diagnóstico de pacientes con síndromes de sobrecrecimiento segmentario asociados a *PIK3CA*, como modelo para el desarrollo de un panel de diagnóstico de NGS que permita detectar mutaciones en mosaicos bajos en un grupo ampliado de síndromes del desarrollo causados por mutaciones post-cigóticas.
3. Protocolo diagnóstico: Elaborar un protocolo diagnóstico para pacientes con PROS y establecer el tipo de muestra (sangre, saliva o tejido) más adecuada para el estudio de cada uno de los síndromes estudiados dentro del espectro PROS.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Pacientes y muestras

El estudio se realizó en el Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), con el apoyo del Centro de Anomalías Vasculares, ambos pertenecientes al Hospital Universitario La Paz de Madrid. Los pacientes y muestras incluidos proceden de la mayor parte del territorio nacional. El estudio cuenta con una cohorte total de 96 pacientes, incluyendo 35 mujeres y 61 hombres. Se conoce la fecha de nacimiento de 88 de estos pacientes, incluyendo por tanto el estudio 81 niños y 7 adultos mayores de 18 años, con una media de edad de 9,8 años, en un rango comprendido entre 1,9 y 42,6 años. Treinta y siete pacientes tenían un diagnóstico clínico previo de Macrocefalia-Malformación Capilar, 25 de síndrome CLOVES, 8 de macrodactilia aislada, y 5 de DCMO. Otros 19 pacientes fueron remitidos a nuestro centro con diagnóstico general de PROS, sin especificar ninguno de los síndromes incluidos en el espectro, debido a que presentaban características solapantes. Se incluyeron además, otros dos pacientes que habían sido remitidos con una clínica poco clara, pero solapante con las características clínicas de PROS (uno con hemihipertrofia aislada y uno con macrocefalia con discapacidad intelectual y autismo). Este estudio cuenta con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario la Paz (Referencia PI-1919). Los consentimientos informados fueron obtenidos de todos los pacientes incluidos en el estudio, o de sus padres/tutores en el caso de pacientes menores de edad.

Siempre que fue posible, se hizo una evaluación clínica presencial por parte de la Sección de Genética Clínica del INGEMM. Se extrajo ADN de las muestras obtenidas de linfocitos de sangre periférica de 80 pacientes, saliva de 44 pacientes y tejido afecto (biopsia de piel, en la mayoría de los casos) de 51 pacientes (la tabla anexa 1 muestra toda la información relativa al tipo de muestra por paciente). Debido a la particularidad y complejidad inherente al diagnóstico molecular en pacientes con sospecha de mosaicismo somático, cabe destacar que disponíamos de muestra de tejido afecto en 17 pacientes diagnosticados como MCAP, 15 pacientes con CLOVES, 5 pacientes con macrodactilia, 4 pacientes con DCMO y 10 pacientes con características clínicas solapantes. El número total de pacientes de los que se disponía de los tres tipos de muestras solicitadas (sangre, saliva y tejido afecto) fue de 32. Asimismo, se obtuvo muestra de sangre periférica de los padres de 52 pacientes.

Se utilizó como tejido afecto muestras de sobrecrecimiento y/o malformación vascular obtenidos durante procedimiento quirúrgico programado como parte del tratamiento de rutina. Cuando este tipo de muestra no pudo obtenerse, se solicitó explícitamente la obtención de biopsias cutáneas a partir de regiones con malformación vascular y/o

sobrecrecimiento. En todos los casos se diferenció entre un sobrecrecimiento real y una asimetría como consecuencia de una malformación vascular.

Todas estas muestras fueron procesadas por la Sección de Pre-analítica del INGEMM, así como por el servicio de cultivos celulares en el caso de los tejidos, para una posterior extracción de ADN. En el caso de las muestras de sangre, la extracción de ADN se realizó por métodos rutinarios (Chemagic DNA Blood Kit, PerkinElmer, Alemania); las salivas se recolectaron con los kit de Oragene (OG-575) (Genotek, EEUU) y se extrajeron siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante; las muestras de tejido afecto fresco se procesaron según los protocolos estándar, y en algunos casos se procedió a su cultivo celular para posteriormente obtener más ADN. Por último, de algunos pacientes únicamente se disponía de muestras de tejido embebido en parafina, por lo que se procedió a su corte y extracción siguiendo el protocolo estándar.

3.2 Estudios de secuenciación masiva (NGS)

Se realizaron estudios de NGS en 85 de los 96 pacientes de los cuales se disponía algún tipo de muestra de ADN. Para el estudio de las muestras se utilizaron tres paneles de genes diferentes. Dos de los tres paneles fueron diseñados dentro de este proyecto específicamente para el estudio de pacientes con síndromes de sobrecrecimiento segmentario y anomalías vasculares. Los pacientes/muestras en los que no se identificaron variantes patogénicas o probablemente patogénicas en estos dos paneles, fueron posteriormente estudiados, gracias a una colaboración internacional (y estancia de la doctoranda), con un tercer panel también diseñado para el estudio de pacientes con diferentes tipos de Síndromes de Sobrecrecimiento y anomalías vasculares. Este panel fue desarrollado, bajo la dirección del Prof. Leslie Biesecker, en de la Sección de Genómica Clínica del *Metabolic, Medical Genomics and Metabolic Branch -MGMGB-, National Human Genome Research Institute -NHGRI-, National Institute of Health -NIH-* de Estados Unidos de América. Los detalles del diseño y los genes incluidos en este panel son confidenciales, por lo que no se especifican en esta tesis.

3.2.1 Diseño de los paneles de genes

En primer lugar se diseñó el panel de genes llamado “Mosaicos”, que incluía, además del gen *PIK3CA*, otros 19 genes conocidos por su implicación con sobrecrecimiento segmentario y anomalías vasculares: *MTOR, NRAS, AKT3, PIK3CA, FGFR3, RASA1, TSC1, GNAQ, PTEN, HRAS, PTPN11, KRAS, CCND2, AKT1, DICER1, TSC2, NF1, MAP3K3, PIK3R2* y *AKT2*. El estudio de otros genes además de *PIK3CA* se hizo con un doble objetivo, ampliar el espectro

genotípico de los pacientes con diagnóstico clínico de PROS, y usarlo como prueba de concepto en el desarrollo de un panel posterior de diagnóstico que permitiera detectar de forma asistencial mutaciones en mosaico bajo en un grupo ampliado de síndromes del desarrollo causados por mutaciones post-cigóticas. Se diseñó específicamente para la detección de variantes en mosaico. El panel Mosaicos se diseñó para capturar las secuencias de todos los exones y las regiones limítrofes intrón-exón (± 25 pares de bases) de los genes. En el caso del gen *PIK3CA*, se hizo una captura completa del gen desde 100 pares de bases por delante del exón 2 (primer exón codificante) hasta 100 pb por detrás del exón 21 (último exón codificante), incluyendo así todas las secuencias intrónicas del gen. El tamaño total del panel fue de 116 Kb. La profundidad media de lectura esperada se calculó en 1000x. Con este panel se analizaron todas las muestras disponibles hasta Febrero de 2016, fecha del primer corte de realización de experimentos.

El segundo panel de genes diseñado, llamado “MALVA” (Malformaciones Vasculares), incluyó 108 genes asociados a malformaciones vasculares, conteniendo todas aquellas asociadas a sobrecrecimiento: *ACVRL1, AGGF1, AKT1, AKT1S1, AKT2, AKT3, ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL3, ATM, BMP2, CBL, CCBE1, CCM2, CCND2, CDH5, CDKN1A, CDKN1C, COL3A1, CREB3L1, CREBBP, DICER1, EGFL7, EGFR, EIF2C2, EIF4E, EIF4EBP1, EIF4G1, ENG, EP300, EPHA3, ERBB2, FGFR3, FIGF, FKBP1A, FLT1, FLT4, FOXC2, FOXO1, GAB1, GATA2, GDF2, GJC2, GLMN, GNAQ, HIF1A, HRAS, IL6, IL6R, KAT2B, KDR, KIF11, KRAS, KRIT1, MAP2K2, MAP3K3, MAPKAP1, MAPK14, MDM2, MLST8, MTOR, NF1, NOTCH1, NPR3, NR3C2, NRAS, NRP1, NRP2, PCDH12, PDCD10, PIEZO1, PIK3CA, PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, PIK3R6, PTEN, PTPN11, PTPN14, RAF1, RALGDS, RAP1A, RASA1, RASA2, RASA3, RASA4, RHEB, RICTOR, RPS6KB1, RPTOR, RUNX1, RUNX2, SMAD4, SOX18, STAMBP, STRADA, TBC1D7, TCF7L1, TEK, TIE1, TNFSF15, TP53, TSC1, TSC2, VEGFA, VEGFB y VEGFC*. Posteriormente se diseñó una segunda versión del panel (MALVA-V2) para incluir otros cuatro nuevos genes (*GNA11, ELMO2, NARFL, CLEC14A*) descritos en la literatura con posterioridad a la primera versión. Este segundo panel ampliado de genes se diseñó con el objetivo de desarrollar un panel diagnóstico definitivo que incluyera todas las patologías de estudio de la Sección de Malformaciones Vasculares del INGEMM, permitiendo el diagnóstico tanto de mutaciones constitutivas como de mosaicismos somáticos. Para este panel, teniendo en cuenta los resultados del panel Mosaicos, sólo se capturaron las regiones exónicas y bases colindantes del gen *PIK3CA*, ya que las regiones intrónicas no dieron resultados positivos. El tamaño final de la primera versión fue de 319,846 Kb y de la segunda versión de 327,06 Kb. Con este panel se analizaron las muestras obtenidas con posterioridad a Febrero de 2016, incluyendo como control muestras con resultados

positivos y negativos para *PIK3CA* obtenidos a partir de los estudios con el panel Mosaicos. También se utilizaron controles positivos y negativos para otros genes y patologías incluidos en el panel MALVA, cuyas características específicas y resultados obtenidos están fuera del propósito de esta tesis por lo que no se han incluido en este texto.

Los dos paneles fueron diseñados, capturados y analizados con las mismas herramientas, protocolos e instrumentos. Los paneles personalizados se diseñaron utilizando el software NimbleDesign (<https://design.nimblegen.com>) (Roche NimbleGen, Inc. EEUU.): Hg19 NCBI Build 37.1/GRCh37.p13, capturando >98% de todas las regiones de interés (RefSeq) en el panel Mosaicos y más del 99,7% en el panel MALVA. Tanto MALVA como Mosaicos, incluyen en su diseño 26 SNPs con una frecuencia del alelo menor de alrededor de 50%, con el fin de utilizarlos como marcadores de identificación correcta de la muestra, lo que se conoce como *fingerprint* (106). Asimismo, se incluyeron 13 regiones para la determinación del sexo de la muestra, cinco en el cromosoma X y ocho en el cromosoma Y.

3.2.2 Experimentos de secuenciación masiva

Para cada muestra, se crearon librerías (*paired-end*, 2x150 pb) según los protocolos estándar KAPA HTP Library Preparation Kit para plataformas Illumina, SeqCap EZ Library SR (Roche NimbleGen, Inc. EEUU.) y finalmente NEXTflex-96 Pre Capture Combo Kit (Bio Scientific) para el proceso de indexación. Las muestras de ADN capturadas se secuenciaron en el instrumento NextSeq™ 500 (Illumina, Inc. EEUU) utilizando un cartucho HIGH v2 300 ciclos, de acuerdo con el protocolo operativo estándar.

En el caso del panel Mosaicos, se incluyeron 43 muestras por experimento, para poder obtener una profundidad de lectura esperada de 1000x. Para el panel MALVA, se incluyeron 30 muestras por experimento para obtener profundidades de lectura superiores a 500x.

3.2.3 Análisis bioinformático

Todos los análisis bioinformáticos y puesta a punto de herramientas para la detección de mosaicos se llevaron a cabo en estrecha colaboración con la Sección de Bioinformática del INGEMM. Como prueba de concepto y calibración posterior de las herramientas desarrolladas, se realizó previamente la secuenciación de muestras con diluciones seriadas de la proporción entre el alelo de referencia y un alelo mutado de una muestra control positiva para una mutación patogénica en el gen *PTEN*. Para ello se utilizó un panel externo previamente validado en el INGEMM y que había sido diseñado, capturado y analizado con las mismas

herramientas, protocolos e instrumentos que los paneles Mosaicos y MALVA. Con los datos obtenidos se establecieron dos protocolos de análisis diferentes, uno para detección de variantes constitutivas y otro para variantes en mosaico. Todo ello, utilizando modificaciones específicas de herramientas ampliamente utilizadas, validadas por la comunidad científica y de libre acceso a su código fuente.

Una vez secuenciadas las muestras correspondientes a los pacientes incluidos en este trabajo, los datos generados por el instrumento NextSeq™ 500, en forma de archivos bcl, se convirtieron en archivos fastq vinculados utilizando el software bcl2fastq-v2.15.0.4 de Illumina (<https://github.com/brwnj/bcl2fastq>) y pre-procesadas con la herramienta Trimmomatic (107) para eliminar del archivo fastq las secuencias de los adaptadores utilizados durante el protocolo experimental. Posteriormente, las lecturas se asignaron a su correspondiente región del genoma humano hg19/GRCh37 utilizando la herramienta Bowtie2 aligner (108), y las lecturas duplicadas de PCR se eliminaron usando Picard MarkDuplicates (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Se realizó una realineación y recalibración posterior de lecturas para corregir desajustes debidos a la presencia de INDELs utilizando los métodos GATK RealignerTargetCreator/IndelRealigner y BaseRecalibrator, respectivamente. Una vez terminado este pre-procesamiento se continuó con los protocolos diferenciados para variantes constitutivas y variantes en mosaico.

- Protocolo para variantes constitutivas: para la detección de las variantes en heterocigosis presentes en aproximadamente el 50% de las lecturas obtenidas por NGS, se utilizó una combinación de las herramientas GATK Haplotype Caller (109) y LACONv (publicación en preparación), utilizando parámetros de calidad y frecuencia del alelo alternativo estándar.
- Protocolo para variantes en mosaico: las variantes fueron analizadas con herramientas diferentes, disminuyendo los umbrales en los parámetros de calidad y profundidad de lectura hasta mínimos establecidos previamente. Esta estrategia permite retener una cantidad superior de variantes en mosaicos bajos que el protocolo de variantes constitutivas hubiera descartado desde el inicio. A pesar de que muchas de estas variantes podrían ser falsos positivos, la estrategia del análisis fue mantener todos los sitios multialélicos en el archivo vcf para su posterior consideración, priorización y filtrado. Las variantes fueron identificadas con la herramienta samtools mpileup (110) y etiquetadas con bcftools v1.3 (<https://samtools.github.io/bcftools/bcftools.html>). La calidad de alineamiento por nucleótido se estableció en 0,7. Posteriormente, este primer archivo crudo vcf fue anotado incluyendo la fracción correspondiente al alelo con la variante alternativa (AVAF), así como la fracción máxima del alelo con la variante alternativa

(MAVAF) en aquellos sitios con más de un alelo alternativo identificado. Las variantes con AVAF por debajo del umbral fueron filtradas. Asimismo, el archivo vcf se reformateó teniendo en consideración la deconstrucción de los sitios multialélicos, normalizando las posiciones con variantes alternativas frente al genoma de referencia. Finalmente, el vcf se enriqueció compilando la información obtenida para cada variante en el total de las muestras estudiadas en un mismo experimento, permitiendo detectar así falsos positivos intra-experimento. Este tipo de falsos positivos, generados por errores de la plataforma de secuenciación durante el proceso de amplificación y lectura, no suelen ser relevantes en variantes constitutivas ya que suelen estar presentes en un porcentaje bajo de lecturas, pero sí deben ser tenidos en cuenta en la detección de mosaicos bajos. Posteriormente, en el proceso de análisis y filtrado de variantes, es cuando se realiza una comparación de los archivos vcf obtenidos a partir de las muestras de sangre, saliva y tejido afecto de un mismo paciente, para determinar el estado constitutivo o somático de las variantes candidatas.

Por cada uno de los dos análisis específicos, constitutivo y mosaico, se generó un archivo final con las variantes encontradas y anotadas con información de su localización cromosómica, tipo de variante, efecto que produce, si afecta al splicing, conservación, frecuencias poblacionales y predictores de patogenicidad. También se generó un informe con diferentes parámetros de calidad en cada muestra estudiada (número y porcentaje de bases con más de 20 lecturas, profundidad media obtenida, número y porcentaje de lecturas alineadas correctamente, número y porcentaje de lecturas sin duplicados, y género de la muestra). De esta forma, las variantes candidatas son visualizadas junto al archivo bam correspondiente, utilizando la herramienta IGV (*Integrative Genomics Viewer*), para verificar las variantes y su correcta anotación.

Por otro lado, el análisis bioinformático aplicado por la Unidad de Bioinformática del NIH para el estudio de las muestras estudiadas con el panel externo, se basó en una comparación entre las muestras de tejido afecto (biopsia de piel u otros tejidos) y no afecto (sangre), generando un único archivo compilado por paciente. Asimismo, cuando se detectó una variante en las muestras de un paciente, se realizó un análisis de la posición en la cual se situaba dicha variante, en el resto de muestras incluidas en la misma carrera de NGS, para verificar la calidad de la región y determinar si se trataba de un falso positivo o la variante estaba presente sólo en esas muestras con un mosaico variable.

3.2.4 Análisis y filtrado de variantes

Una vez obtenidos los archivos con las variantes correspondientes a cada muestra, tanto con el protocolo constitutivo como con el mosaico, se procedió al filtrado según las anotaciones para cada variante. Dado que el único gen hasta la fecha asociado con el espectro PROS era *PIK3CA*, primero se buscaron variantes candidatas en este gen. En caso negativo, se procedió al estudio de los demás genes del panel para descartar variantes que pudieran estar produciendo fenotipos solapantes con el espectro PROS. En todos los casos las variantes fueron excluidas como candidatas y filtradas cuando 1) estaban presentes en >1% de frecuencia poblacional en las bases de datos ExaC (<http://exac.broadinstitute.org/>), 1000Genomes (<http://www.internationalgenome.org/1000-genomes-browsers/>), ESP6500 (<https://esp.gs.washington.edu/drupal/>), Spanish Variant Server (<http://csvs.babelomics.org/>) y controles internos del INGEMM; 2) una misma variante aparece en más de 10 muestras procesadas en el mismo experimento, para descartar falsos positivos originados por errores propios de la técnica; 3) la profundidad de lectura de la variante (alelo alternativo) era <5x, por encontrarse en el rango de ruido de fondo inherente a la técnica; 4) los predictores de patogenicidad (CADD (111), SIFT (112), Polyphen (113), MutAssesor (114), Fathmm (115), VEST (116) y MutationTaster (117)) coinciden mayoritariamente en clasificar a la variante como benigna; 5) la variante era clasificada como cambio sinónimo en la proteína o corresponde a una variante intrónica sin consecuencias para el *splicing*.

Las variantes candidatas resultantes fueron visualizadas con el visor IGV, estableciendo una frecuencia de alelo alternativo del 2%, con el cual se pudieron ver apiladas todas las lecturas obtenidas de una variante frente al genoma de referencia (hg19). También se realizó una búsqueda exhaustiva de la variante y su posible consecuencia en la literatura científica. En los casos en los que no se detectó ninguna variante candidata, se hizo una segunda visualización de todos los nucleótidos de todos los exones del gen *PIK3CA* en busca de posibles variantes que hubieran sido filtradas por presentar rangos de mosaicismo inferiores a los establecidos.

3.3 Validación de variantes

Las variantes encontradas en cada muestra se validaron utilizando tres técnicas diferentes en función del porcentaje de lecturas alternativas que se obtuvieron del análisis de NGS.

3.3.1 Secuenciación Sanger

La secuenciación Sanger se utilizó para confirmar las variantes presentes en más del 15% de las lecturas en los datos obtenidos por NGS. Tras una PCR estándar se realizó la secuenciación Sanger usando el secuenciador ABI 3730xl de 96 capilares (Applied Biosystem, Foster City, EEUU). También se utilizó la combinación de *long-range* PCR y secuenciación Sanger para verificar la ubicación cromosómica en variantes encontradas en regiones con alta homología (exones 10 al 14 de *PIK3CA*) con otra región del genoma (cromosoma 22). La *long-range* PCR se realizó según protocolo estándar con reactivos Sigma-Aldrich (EEUU) y enzima Expand long range dNTPack de Roche (Alemania). La Tabla 5 muestra los oligonucleótidos utilizados para la realización de secuenciación Sanger de las variantes encontradas en los genes *PIK3CA*, *AKT3* y *mTOR*.

Tabla 5: Oligonucleótidos utilizados para la realización de secuenciación Sanger para validar las variantes detectadas con NGS en los genes *PIK3CA*, *AKT3*, *mTOR*.









































Gen	Nº Exón	Oligonucleótido directo (5'→3')	Oligonucleótido reverso (3'→5')
<i>PIK3CA</i>	2.1	GCCTAATCAAGTCAAATATGGAAA	CGAAGGTATTGGTTTAGACAGAAA
<i>PIK3CA</i>	2.2	CCCCTCCATCAACTTCTTCA	TCTAAGTCATCCACAAATGACA
<i>PIK3CA</i>	3	TCTACAGAGTTCCTGTTTGC	ATAAGCAGTCCCTGCCTTCA
<i>PIK3CA</i>	4	TTGGGCTGATTAATAAGCAT	CCTGGGCGAGAGTGAGATT
<i>PIK3CA</i>	5	CCTTTCAGATTAATATGTAGTCATAA	CGGAGATTTGGATGTTCTCC
<i>PIK3CA</i>	6	TTAGTGGATGAAGGCAGCAA	CTGGCCAGTGCCTAGCTAAT
<i>PIK3CA</i>	7	TTCCTGTTTTTCGTTTGGTTG	CCTGAAGCTCTCCCAAGGTA
<i>PIK3CA</i>	8	GGGGAAAAGGAAAGAATGG	TTGGCATGCTCTTCAATCAC
<i>PIK3CA</i>	9	TGGCCAGTACCTCATGGATT	GAAGGCAAGCTAGGGCTTTA
<i>PIK3CA</i>	10	TGGTTCTTCTGTCTCTGAAAA	ACATGCTGAGATCAGCCAAA
<i>PIK3CA</i>	11	TCCATTGCATTTTCTTTTG	TGGAAATAATGTTAAGGGTGTTTTT
<i>PIK3CA</i>	12	AAAATCAGAAGTTAAGGCAGTGT	GCATGGCCGATCTAAAGAAA
<i>PIK3CA</i>	13	CCAGTAATATCCACTTCTTTCTGA	GGAAAACTCTCCAGCCAAA
<i>PIK3CA</i>	14	CCTGAACTCATGGTGGTTT	GCTGAGAGGCAGTGGAACCT
<i>PIK3CA</i>	15	ACACAGTGCTGCCAGTCTTG	TGAGGGTAGGAGAATGAGAGAGA
<i>PIK3CA</i>	16	GGATTCTAAATAAAAATTGAGGTGA	TGGCTTTCAGTAGTTTTCATGG
<i>PIK3CA</i>	17	TTGCTTTCCTGAAGTTTCTTTTG	CCAGAGGCAGTAGCAGAGTG
<i>PIK3CA</i>	18	GGGGAAAGGCAGTAAAGGTC	TCAAATATTTCAAAGGTTGAGCA
<i>PIK3CA</i>	19	TGGAACTTGACACCTGTTT	GTCAAAACAAATGGCACACG
<i>PIK3CA</i>	20	TCATGGTGAAAGACGATGGA	GTTACCCAGGCTGGTTTCAA
<i>PIK3CA</i>	21	TGGGGTAAAGGGAATCAAAA	ATCAAACCCTGTTTGC GTTT
<i>AKT3</i>	9	CACGTGAAGCAACAGAGTTTG	TTCTTGATCCTACAATACCCATT
<i>mTOR</i>	6	AGTGTAGATGGGATGGGCCT	CCGGTACACCAGCCATACTT
<i>mTOR</i>	21	CGCAGACCATGCTCACTACA	AATGGGCATCAACCTGTCACT
<i>mTOR</i>	31	TTTCATATCACAGAGTTAGGCATGG	TGTGCACCGTTTTCTTGG
<i>mTOR</i>	39	CTGTTCTCAGCATCGACCTT	CAAAGCCCTATCTCAGGCAGT
<i>mTOR</i>	47	TCTCTGAATGCAGTGGTGC	GCCTCAACCTCTGGAGTTTCT













3.3.2 Pirosecuenciación

Las variantes con lecturas del alelo alterativo incluidas en un rango de entre el 5 y el 15% de lecturas detectadas por NGS fueron confirmadas por pirosecuenciación. Los oligonucleótidos de pirosecuenciación (Tabla 6) se diseñaron usando el software PyroMark, la reacción se preparó con reactivos QIAGEN, su lectura se hizo con el instrumento Pyromark Q96 MD (QIAGEN, EEUU), siguiendo el protocolo del fabricante, y los resultados fueron analizados con el PyroMark Software (Qiagen, Hilden, Alemania). Para el estudio de variantes situadas en los codones 542 y 545 del gen *PIK3CA*, se utilizaron oligonucleótidos previamente diseñados por Baker y colaboradores para evitar amplificar la región altamente homóloga a los exones 10 a 14 del gen *PIK3CA* y localizada en el cromosoma 22 (Tabla 7) (118). Además, para el estudio de variantes en esta región de alta homología, se comparó la eficiencia entre pirosecuenciación realizada directamente en ADN genómico, o pirosecuenciación realizada en ADN producto de una *long-range* PCR previa (según protocolo estándar con reactivos Sigma-Aldrich (EEUU) y enzima Expand Long Range dNTPack de Roche (Alemania)), diseñada para abarcar toda la región desde el exón 10 al 14 de *PIK3CA*.

Tabla 6: Oligonucleótidos sentido, antisentido y de secuenciación utilizados para la validación mediante pirosecuenciación de las diferentes variantes detectadas con NGS en *PIK3CA*, *AKT3*, *mTOR* y *PTEN*.




Gen	Variante	Oligonucleótidos: sentido, antisentido y de secuenciación	Secuencia a analizar
<i>PIK3CA</i>	c.241G>A; p.Glu81Lys	➤ AGCAAGAAAATACCCCTCCAT ↯ TTGAAAAAGCCGAAGGTCACAA ➔ AAGAAGCAGAAAGGGA	ARAATTTTGTATGAAACA AGACGACTT
<i>PIK3CA</i>	c.331A>G; p.Lys111Glu	➤ TCGGCTTTTCAACCTTTTT ↯ ATCATACCAATTCTCGATTGAGG ➔ CAGTAGGCAACCGTG	AAGAARAGATCCTCAATCG AGAAATTGGTATGA
<i>PIK3CA</i>	c.344G>C; p.Arg115Pro	➤ CAACCGTGAAGAAAAGATCCTC ↯ TTAGAAAGGGACAACAGTTAAGC ↯ GATATTGTATCATACCAATT	TCTSGATTGAGGATCTTTT CTTCACGGTTGC
<i>PIK3CA</i>	c.353G>A; p.Gly118Asp	➤ TGTTTCATGCTGTGTATGTAATAGA ↯ CTTCTGGATCTTTAACCATATCAA ➔ ATGTTATATTCTTTATGTAATT	TTATTAAAGRTTTTGCTATC GGCATGCCAGTGTGTGAA TT T
<i>PIK3CA</i>	c.1133G>A; p.Cys378Tyr	➤ AGGAGAACCCTTATGTGACAATGT ↯ CCCAGGCTGGTCTAAAAAATAT ➔ TGTGAACACTCAAAGAGTAC	CTTRTTCCAATCCCAGGTA AGGAAGTATATAG
<i>PIK3CA</i>	c.1132T>C; p.Cys378Arg	➤ AGGAGAACCCTTATGTGACAATGT ↯ CCCAGGCTGGTCTAAAAAATAT ➔ TGTGAACACTCAAAGAGTAC	CTYGTTCGAATCCCAGGTA A GGAAGTATAT
<i>PIK3CA</i>	c.1258T>C; p.Cys420Arg	➤ GAATTTTCCTTTGGGGAAGA ↯ ACAAGTTTATATTTCCCATGCC ➔ ATTTTCTTTGTTTTTAAG	GAACACYGTCCATTGGCAT G GGGAAATATAAATT

PIK3CA	c.1357G>A; p.Glu453Lys	 TTGGCCAGTACCTCATGGA  CCAGTAACACCAATAGGGTTCAG  GCCAGTACCTCATGGA	TTARAAGATTGCTGAACC C TATTGGTGTTAC
PIK3CA	c.1571G>A; p.Arg524Lys	 GGGGAAAAATATGACAAAGAAAGC  AAAATCTTTCTCCTGCTCAGTGA  ACTAGCTAGAGACAATGAAT	TAARGGAAAATGACAAAG AA CAGCTCAAAGCA
PIK3CA	c.1624G>A; p.Glu542Lys	 GGGGAAAATGACAAAGAACAGCT  GAAAATCTTTCTCCTGCTCAGTG  AATTTCTACACGAGATCCT	CTCTCTRAAATCACTGAGC AGGAGAAAGATTTTCT
PIK3CA	c.1634A>G; p.Glu545Gly	 ACAGCTCAAAGCAATTCTACACG  GCACTTACCTGTGACTCCATAGAA  CGAGATCCTCTCTCTGAAAT	CACTGRGCAGGAGAAAGA TTTCTATGGAGTCAC
PIK3CA	c.1638G>T; p.Gln546His	 AAGGGAAAATGACAAAGAACAGCT  GCACTTACCTGTGACTCCATAGAA  TCCTCTCTCTGAAATCACT	GAGCAKGAGAAAGATTTT CTATGGAGTCACAGG
PIK3CA	c.1637A>T; p.Gln546Leu	 AAGGGAAAATGACAAAGAACAGCT  GCACTTACCTGTGACTCCATAGAA  TCCTCTCTCTGAAATCACT	GAGC W GGAGAAAGATTTT CTATGGAGTCACAG
PIK3CA	c.2176G>A; p.Glu726Lys	 AGCACCTGAATAGGCAAGTCG  ACACTGGGCTTCTAAACAACTCTG  TCTCAAACAGGAGAAGAA	GGATRAAACACAAAAGGT ACAGATGAAGTTTTT
PIK3CA	c.2726T>G; p.Phe909Cys	 TTTACACGTTTCATGTGCTGGATAC  CCATCGTCTTTCACCATGATGT  GCTGGATACTGTGTAGC	TACCTKCATTGTTGGGAATT GGAGATCGTCACAAT
PIK3CA	c.2740G>A; p.Gly914Arg	 ATATGATGCAGCCATTGACCT  ATCGTCTTTCACCATGATGTTACT  CTACCTTCATTTTGGGA	ATT R GAGATCGTCACAATA GTAACATCATGGT
PIK3CA	c.2816A>G; p.Asp939Gly	 GCTGTTTCATATAGATTTTGGACA  ACAAATGGCACACGTTCTCG  CATATAGATTTTGGACACTT	TTTGGRTCACAGAAGAA AAAATTTGGTTATAA
PIK3CA	c.3062A>G; p.Tyr1021Cys	 GATGCTTGGCTCTGGAATG  GAAATACTCCAAAGCCTCTTGC  AACTACAATCTTTTGATGAC	ATTGCATRCATTGAAAGA CCCTAGCCTTAGATAAA
PIK3CA	c.3061T>C; p.Tyr1021His	 GATGCTTGGCTCTGGAATG  GAAATACTCCAAAGCCTCTTGC  AACTACAATCTTTTGATGAC	ATTGCAYACATTGAAAGA CCCTAGCCTTAGATAA
PIK3CA	c.3104C>T; p.Ala1035Val	 TGACATTGCATACATTCGAAAGAC  TTGTTGTCCAGCCACCATGAT  GCCTTAGATAAAACTGAGC	AAGAGGYTTTGGAGTATTT CATGAAACAAATGAAT
PIK3CA	c.3129G>A; p.Met1043Ile	 AACTGAGCAAGAGGCTTTGGAGTA  TTGTTGTCCAGCCACCATGAT  TTGGAGTATTTTCATGAAAC	AAATRAATGATGCACATCA TGGTGGCTGGACAA
PIK3CA	c.3140A>G; p.His1047Arg	 AGCAAGAGGCTTTGGAGTATTTT  TGCTGTTAATTGTGTGGAAGATC  CATGAAACAAATGAATGAT	GCACRTCATGGTGGCTGG ACAACAAAAATGGAT
PIK3CA	c.3139C>T; p.His1047Tyr	 AGCAAGAGGCTTTGGAGTATTTT  TGCTGTTAATTGTGTGGAAGATC  CATGAAACAAATGAATGAT	GCAYATCATGGTGGCTGG ACAACAAAAATGGA

AKT3	c.863C>T; p.Thr288Ile	 GGAGAATCTAATGCTGGACAAA  TGCATCTGTGATCCCTTCTTT  AAAGATGGCCACATAAA	AATTAYAGATTTTGGACTT TGCAAAGAAGGGATC
mTOR	c.743C>T; p.Thr248Ile	 GGCACCCTGTCTCTCTACATAGC  TCCGATCATCCCGATTCA  GCCCTTCTCTTTGGC	CAAGRTCTCATCAAATCCC TTCTCTGCTTCTT
mTOR	c.4448G>A; p.Cys1483Tyr	 AACCAAGGACGACCCAGAGC  GCCATCATTCTAGGAAGCTCACC  ATGCTGGGCCGCATG	CGCTRCCTCGAGGCCTTGG GGGAATGGTGAGCT
PTEN	c.388C>T; p.Arg130Stop	 GACAATCATGTTGCAGCAATTC  TTAAAAATTTGCCCCGATGTAA  CTGTAAAGCTGGAAAGG	GAYGAACTGGTGTAAATGA TATGTGCATATT

Los oligonucleótidos que están marcados con una flecha con un círculo blanco en el extremo, son aquellos que están biotinilados en el extremo 5'. En la secuencia a analizar aparecen los cambios de nucleótido marcados con el código de ambigüedad en negrita: K= T/G; M = A/C; R= G/A; S= C/G; W = A/T; Y = T/C.

Tabla 7: Oligonucleótidos sentido, antisentido y de secuenciación utilizados para evitar la región de homología que presentan los exones 10 al 14 de *PIK3CA* en el cromosoma 22, así como para verificar que no se estaba amplificando dicha región. Modificados de (118).

Gen	Variante	Oligonucleótidos: Sentido, antisentido y de secuenciación	Secuencia a analizar
PIK3CA	c.1624G>A; p.Glu542Lys	 ATTTCTACACGAGATCCTCTCTCT  CCATTTTAGCACTTACCTGTGAC  TTCTCCTGCTCAGTGAT	TTYAGAGAGAGGATCTCGT GTAGAAATT
PIK3CA	c.1633G>A; p.Glu545Lys	 ATTTCTACACGAGATCCTCTCTCT  CCATTTTAGCACTTACCTGTGGT  TAGAAAATCTTTCTCCTG	CYCAGTGATTTCAGAGAGA GGATCTCG
Región de homología	Equivalente a <i>PIK3CA</i> c.1633G>T	 ATTTCTACACGAGATCCTCTCTCT  CCATTTTAGCACTTACCTGTGGT  TAGAAAATCTTTCTCCTG	CKCAGTGATTTCAGAGAGA GGATCTCG

Los oligonucleótidos que están marcados con una flecha con un círculo blanco en el extremo, son aquellos que están biotinilados en el extremo 5'. En la secuencia a analizar aparecen los cambios de nucleótido marcados con el código de ambigüedad en negrita: K= T/G; Y = T/C.

3.3.3 Droplet digital PCR (ddPCR)

Las variantes en *PIK3CA* encontradas por debajo del 7% de lecturas de NGS se validaron por la técnica ddPCR, una técnica relativamente nueva basada en el sistema de sondas Taqman. La ddPCR consiste en un primer paso de generar miles de gotas, seguido de una PCR de amplificación, y por último un paso de lectura y análisis de resultados (Figura 4). Para todo ello se utiliza el sistema QX200 de Bio-Rad (California, EEUU), siguiendo el protocolo

establecido para ello, así como los reactivos de la misma casa comercial. Para el estudio de las diferentes variantes a validar en este trabajo (c.344G>C; p.Arg115Pro, c.1258T>C; p.Cys420Arg, c.1357G>A; p.Glu453Lys, c.1624G>A; p.Glu542Lys, c.1633G>A; p.Glu545Lys, c.2176G>A; p.Glu726Lys, c.3129G>A; p.Met1043Ile, c.3139C>T; p.His1047Tyr, c.3140A>G; p.His1047Arg) se utilizaron sondas Taqman previamente diseñadas por Applied Biosystems (California, EEUU). Al igual que en el caso de la pirosecuenciación, para el estudio de variantes en la región de alta homología con el cromosoma 22, se comparó la eficiencia entre ddPCR realizada directamente en ADN genómico, o ddPCR realizada en ADN producto de una long-range PCR previa (según protocolo estándar con reactivos Sigma-Aldrich (EEUU) y enzima Expand Long Range dNTPack de Roche (Alemania)).

Asimismo, esta técnica fue empleada para la búsqueda de las tres variantes más frecuentes en *PIK3CA* descritas en pacientes PROS: c.1624G>A; p.Glu542Lys, c.1633G>A; p.Glu545Lys y c.3140A>G; p.His1047Arg. Se realizó el estudio en aquellos pacientes en los que no se había detectado ninguna variante previamente con el estudio del panel mosaicos mediante NGS, o en aquellos en los que se había recibido nuevas muestras y no habían sido estudiadas con dicho panel de NGS. El protocolo empleado para la realización de la técnica es el mismo que en el caso de la validación de variantes ya identificadas.

3.3.4 RFLP (de las siglas en inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Las variantes detectadas mediante el tercer panel de genes de NGS en EEUU, fueron validadas por medio de la técnica RFLP, basada en el reconocimiento de dianas de restricción para enzimas de restricción específicas. Esta técnica permite detectar variantes en porcentajes bajos. Para el estudio de las variantes encontradas, en primer lugar se realizó el diseño de los oligonucleótidos (Tabla 8) (Integrated DNA Technologies, EEUU) con el programa informático SeqBuilder Pro (DNASTAR, EEUU), y se siguió el protocolo estándar para la técnica, utilizando para la amplificación del ADN un mix que incluía AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), el oligonucleótido directo marcado con FAM en el extremo 5' y el oligonucleótido reverso sin marcar. El oligonucleótido reverso fue modificado en la posición correspondiente a cada variante de *PIK3CA* a estudiar, para posteriormente utilizar una enzima específica (Tabla 8) que cortaba únicamente la secuencia alternativa y no la nativa, pudiendo discriminar así por el tamaño de los fragmentos obtenidos. Los fragmentos fueron detectados en el ABI3130 utilizando un límite mínimo de señal de 100 unidades de fluorescencia relativa (rfu); considerando los picos por debajo de este límite como valor de cero. Las áreas por debajo de los picos fueron utilizadas para calcular la proporción de producto de PCR alternativo (área de

alternativo/(área alternativo + área nativo)). Cuando fue necesario, se optimizaron los tiempos de inyección para una correcta detección de la altura de los picos.

Finalmente los resultados obtenidos se analizaron mediante el programa informático GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems, EEUU).

Tabla 8: Oligonucleótidos diseñados para el estudio de las variantes detectadas en *PIK3CA* en la colaboración con el laboratorio del Prof. Biesecker en EEUU.

Variante	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso	Enzima
PIK3CA:p.Glu81Lys	CTTTAGAATGCCTCCGTGAG	CACAAAGTCGCTTGTTCATCAAAAAATA	Sspl-MR
PIK3CA:p.Cys378Tyr	CTATCGAGTGTGTGCATATG	ACTTCCTTACCTGGGATTGGAT	MseI-MR
PIK3CA:p.Cys378Arg-1	AGTCTATCGAGTGTGTGCATATG	TCCTTACCTGGGATTGGCAC	BssSI
PIK3CA:p.Cys378Arg-2	GTGACAATGTGAACACTCAAAGAGTACCG	CCAAAGCGCTGGGATTACAGG	AcI
PIK3CA:p.Gln546Lys	TACACGAGATCCTCTCTCTG	TGCTGAGATCAGCCAAATTCAG	AluI
PIK3CA:p.His1047Arg	CTGAGCAAGAGGCTTTGGAG	AGTGTGGAATCCAGAGTGAG	BmgBI

La última columna indica la enzima necesaria para realizar el paso de digestión en el protocolo llevado a cabo.

3.4 Estudios funcionales

En aquellas variantes que fueron detectadas mediante NGS y validadas mediante las técnicas descritas previamente, y de las cuales no se sabía cuál era su efecto en la función de la proteína, ya fuera por no estar descritas previamente en la literatura (*PIK3CA*: c.2726T>G: p.Phe909Cys), o porque no había ningún estudio que demostrara su efecto (*PIK3CA*: c.344G>C: p.Arg115Pro, *PIK3CA*: c.A3062A>G: p.Tyr1021Cys, *PIK3CA*: c.3061T>C:p.Tyr1021His), se realizaron estudios de mutagénesis dirigida y transfección celular.

Mutagénesis dirigida

El plásmido utilizado para el estudio de las variantes identificadas en el gen *PIK3CA*, fue el siguiente: PCIG-*PIK3CA*-Wildtype (Addgene plasmid # 73056 (119)). Este plásmido incluye el vector PCIG, así como un clon de cDNA humano de *PIK3CA*. Además, incluye un gen de resistencia a ampicilina, que servirá como marcador de selección, y un gen que codifica la proteína GFP, que servirá como control de transfección. El tamaño total del plásmido es de 9404pb. Debido al gran tamaño de este plásmido, se optó por realizar los experimentos de mutagénesis dirigida utilizando un plásmido más pequeño, pBlueScript (Stratagene, EEUU) (2916 pb), en el cual se clonó nuestro inserto *PIK3CA* que estaba incluido en el plásmido PCIG-*PIK3CA*-Wildtype, y posteriormente se volvió a clonar el inserto con las variantes de interés en

el plásmido inicial. Para ello, se seleccionaron dos enzimas de restricción utilizando el software ApE (A plasmid Editor v2.0.53c), las cuales tenían una única diana de restricción tanto en nuestro plásmido con el inserto como en el plásmido en el cual introdujimos dicho inserto, y se encontraban en la misma dirección y orden para que no hubiera problemas al insertar el inserto: XhoI (Diana de restricción: 5'CTCGAG3') y XmaI (Diana de restricción: 5'CCGGG3') (ambas de New England Biolab, EEUU). Se siguieron protocolos estándar de clonación, hasta obtener el plásmido pBlueScript con la secuencia de *PIK3CA* en su interior (Figura 10).

Las variantes identificadas en los pacientes, se introdujeron en pBlueScript-*PIK3CA* utilizando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, EEUU), utilizando oligonucleótidos diseñados mediante la herramienta proporcionada por la empresa Agilent para dicho kit (Tabla 9) (www.agilent.com/genomics/qcpd). Una vez confirmada la presencia de las variantes en los plásmidos mediante secuenciación Sanger utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla 10), se realizó la digestión de cada plásmido pBS-*PIK3CA*, y se clonaron los insertos *PIK3CA* con las variantes introducidas en el plásmido PCIG, con el cual se continuó el proceso de transfección celular.

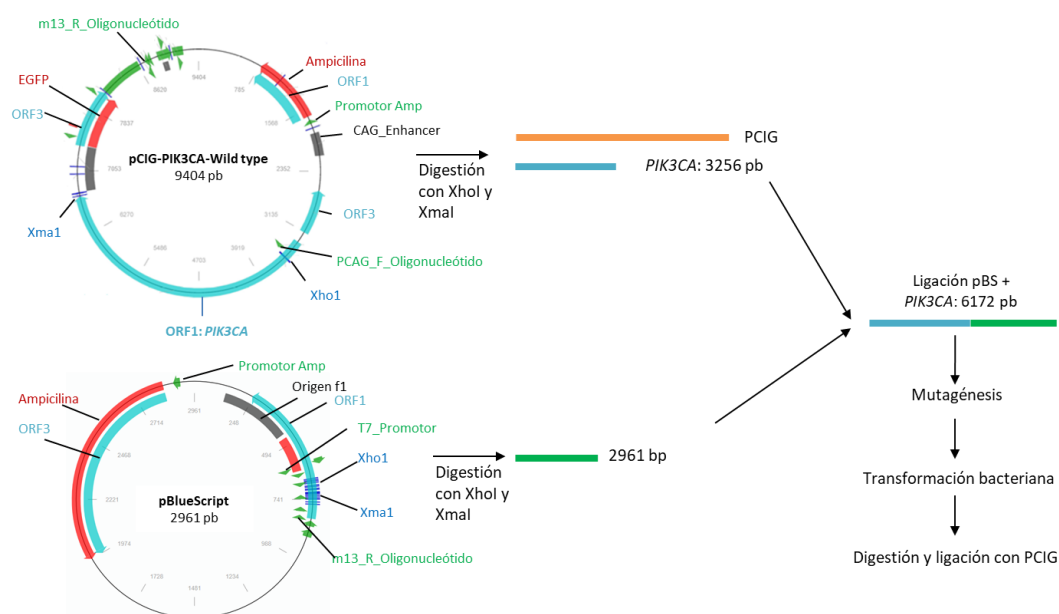


Figura 10: Proceso de clonación llevado a cabo con los plásmidos PCIG-*PIK3CA*-WildType y pBlueScript (pBS). La digestión se llevó a cabo con las enzimas XhoI y XmaI y el buffer CutSmart. Para la ligación se utilizó la enzima T4-Ligasa, y para la transformación bacteriana, se utilizaron las células competentes DH5α.

Tabla 9: Oligonucleótidos diseñados para realizar la mutagénesis de las variantes en *PIK3CA* que se estudiaron.

Nombre	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso
PIK3CA:Arg115Pro	GCAGAAAGGGAAGAATTTCTTGATGAAACAAGACG	CGTCTTGTTTCATCAAGAAATCTCCCTTTCTGC
PIK3CA:Phe909Cys	GGATACTGTGTAGCTACCTGCATTTTGGGAATTGGAG	CTCCAATCCCAAATGCAGGTAGCTACACAGTATCC
PIK3CA:Tyr1021Cys	GATGACATTGCATGCATTGAAAGACCCTAGCC	GGCTAGGGTCTTTCGAATGCATGCAATGTCATC
PIK3CA:Tyr1021His	CTTTTGATGACATTGCACACATTCGAAAGACCCTAGCC	GGCTAGGGTCTTTCGAATGTGTGCAATGTCATCAAAAG
PIK3CA:His1047Tyr	CAAATGAATGATGCACGTCATGGTGGCTGGCAAC	GTTGTCCAGCCACCATGACGTGCATCATTTCATTG

Tabla 10: Oligonucleótidos empleados para secuenciar el inserto de *PIK3CA* incluido en nuestro plásmido.

Nombre	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso
Inserto PIK3CA_1	CCTCCATCAACTTCTTCAAG	CGGTTGCCTACTGGTTCAT
Inserto PIK3CA_2	CCAGTAGGCAACCGTGAAGAAAAG	TTTGGCAATTCTGGTGAAGA
Inserto PIK3CA_3	CTTACCAGAATTGCCAAAGCAC	TTCAGAGGATAGCAACATACTTCG
Inserto PIK3CA_4	GATGCCCAATTTGATGTTGATG	CATTCACGTAGGTTGCACAAA
Inserto PIK3CA_5	CGAACAGGTATCTACCATGGAGG	GAGCAAATGGAAAGGCAAAG
Inserto PIK3CA_6	GGTGTTACTGGATCAAATCC	CCTGCGTGGGAATAGCTAAA
Inserto PIK3CA_7	CGAAATTCTACCCAAATTGC	GAACAGCAAAACCTCGAACC
Inserto PIK3CA_8	CTAATCAAAGGATTGGGCAC	CATTGCCTCGACTTGCCTAT
Inserto PIK3CA_9	GGCTTTCTGTCTCTCTAAAC	GCCGTAAATCATCCCCATTT
Inserto PIK3CA_10	GTGACTGTGTGGGACTTATTG	TCCAATCCCAAATGAAGG
Inserto PIK3CA_11	GTGTAGCTACCTTCATTTTGG	CAAAACAAATGGCACACGTT
Inserto PIK3CA_12	GATGCTTGGCTCTGGAATGC	AGCCTGCAGGTCAGTTCAAT

Transfección celular

Los plásmidos que contenían *PIK3CA*, fueron transfectados en células COS7, las cuales provienen de tejido de riñón de mono (*Cercopithecus aethiops*), y tienen morfología de fibroblasto humano. La transfección se llevó a cabo con el kit Lipofectamine™ 3000 Reagent (Thermo Fisher Scientific, EEUU), siguiendo el protocolo establecido para placas de 6 pocillos, y manteniendo las células en medio con 10% de suero fetal bovino, penicilina/estreptomicina y fungicida. Para el posterior estudio de fosforilación de AKT por Western Blot, a las 24 horas después de la transfección, se cambió el medio de las células a un medio sin suero fetal bovino para analizar los resultados en condiciones de ausencia de factores que favorezcan el crecimiento celular, y 48 horas después se recogieron las células. A continuación, se llevó a cabo la extracción y cuantificación de las proteínas utilizando los protocolos para el kit Instant

One ELISA 1X (eBiosciences, EEUU), y para el kit Bio-Rad QuickStar Bradford (Bio-Rad, California, EEUU), respectivamente.

Western Blot

Los estudios mediante Western Blot fueron realizados siguiendo protocolos estándar. Los geles utilizados para separar las proteínas fueron Novex™ WedgeWell™ 8-16% Tris-Glycine Gel con 15 pocillos de 10mm cada uno (Invitrogen, EEUU). Los lisados de proteínas se separaron utilizando SDS/PAGE y se transfirieron a membranas incluidas en el kit iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocelulose, Regular (Invitrogen, EEUU), siguiendo el protocolo establecido para ello. Se bloqueó* la membrana durante una hora a temperatura ambiente con el buffer de bloqueo Odyssey con PBS (LI-COR, EEUU) en un agitador orbital con agitación suave, y posteriormente se incubó con los diferentes anticuerpos primarios que se utilizaron. Se añadieron simultáneamente dos anticuerpos primarios, siendo en la mayoría de los casos la forma fosforilada y la forma total de la proteína a estudiar, para poder realizar el cálculo del ratio posteriormente:

- Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® Rabbit mAb (#4060) y Akt (pan) (40D4) Mouse mAb (#2920)
- Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser240/244) (D68F8) XP® Rabbit mAb (#5364) y S6 Ribosomal Protein (54D2) Mouse mAb #2317

Todos ellos obtenidos de Cell Signaling Technology (EEUU).

Tras la incubación, se lavó la membrana con un buffer salino con Tris y Tween 20 (pH 7.4), y se incubó con los anticuerpos secundarios (anti-rabbit IRDye 800CW (LI-COR, EEUU) y anti-mouse IRDye 680LT (LI-COR, EEUU)) durante una hora a temperatura ambiente.

Los anticuerpos secundarios que se utilizaron llevaban asociados fluoróforos infrarrojos, que se detectan en el revelado posterior. De esta manera, la señal que se capta es directamente proporcional a la cantidad de proteína.

Las membranas fueron escaneadas en el aparato *Odyssey CLX Infrared Imaging System* (LI-COR, EEUU), el cual permite revelar Western blot detectando la fluorescencia infrarroja (120). Asimismo, es capaz de detectar dos longitudes de onda simultáneamente (en color rojo y verde), lo que permitió cuantificar dos proteínas al mismo tiempo (la proteína fosforilada y la proteína total). La imagen de anticuerpos IRDye™800 (en nuestro caso correspondiente a la proteína fosforilada) se capturó a 800 nm, visualizándose en verde, mientras que la de anticuerpos IRDye 680LT se detectó a 680 nm, observándose en rojo.

Finalmente, se calcularon las intensidades de cada banda utilizando el programa informático Image Studio Versión 5.2 (LI-COR, EEUU). Los valores obtenidos de cada banda correspondiente a las proteínas fosforiladas de cada lisado, se normalizaron frente a los valores obtenidos en esa misma membrana de las bandas correspondientes a la proteína total de esos mismos lisados, obteniendo un ratio (proteína fosforilada/proteína total) en cada caso. Por ejemplo, en el caso del estudio de los niveles de fosforilación de AKT, el ratio se calculó dividiendo el valor de la proteína fosforilada (pAKT) en cada lisado con la variante correspondiente, entre valor de la proteína AKT total (pan-AKT) en esos mismos lisados. Los valores de los ratios obtenidos en cada caso, se utilizaron posteriormente para realizar los análisis estadísticos pertinentes.

*En el caso del estudio realizado para la proteína GFP (GFP Antibody #2555, Cell Signaling technology, EEUU), previamente al bloqueo de membrana, se utilizó el kit REVERT™ Total Protein Stain (LI-COR, EEUU) siguiendo el protocolo de la casa comercial, y se escaneó la membrana en el aparato Odyssey CLX (LI-COR, EEUU), obteniendo la imagen del total de proteínas de cada lisado, que se utilizó posteriormente para normalizar la señal de la proteína GFP. Posteriormente, se continuó con el proceso de incubación igual al resto de muestras, con la diferencia del uso de un anticuerpo secundario en lugar de dos, por haber incubado la membrana previamente con un único anticuerpo frente a GFP.

3.5 Análisis estadísticos

Para comparar los ratios (proteína fosforilada/proteína total) obtenidos tras el análisis de las intensidades de las bandas de los Western blot se aplicó un análisis de pruebas paramétricas mediante una t-Student que permite comparar dos muestras independientes bajo la premisa de que ambas muestras tienen una distribución normal. Así se compararon los niveles de fosforilación de los lisados con las variantes de *PIK3CA* estudiadas frente al lisado de las células con la proteína nativa. Para ello, se utilizó el programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, EEUU).

4. RESULTADOS

4.1 Pacientes y muestras.

Gracias a la combinación de estudios clínicos y moleculares, ha sido posible confirmar el diagnóstico clínico inicial en la mayoría de los pacientes (88,5%) y redefinir el diagnóstico clínico en 11 de los 96 pacientes estudiados (11,5%). De estos 11 pacientes, seis (54,5%) fueron reclasificados por sus características clínicas y otros cinco (45,5%) debido a los resultados moleculares. De los 37 pacientes con un diagnóstico inicial de MCAP, tres presentaban características clínicas solapantes con el síndrome CLAPO, por lo que se les denominó MCAP/CLAPO, mientras que otros tres pacientes, fueron reclasificados como síndrome de Smith-Kingsmore (SKS) con posterioridad a la detección de una variante patogénica en el gen *mTOR*. De los 25 pacientes con un diagnóstico inicial de CLOVES, dos presentaban características clínicas solapantes con pacientes MCAP, por lo que se reclasificaron como CLOVES/MCAP; asimismo, un tercer paciente fue diagnosticado con un trastorno relacionado con alteraciones en *PTEN* (PHTS, por sus siglas en inglés: *PTEN Hamartoma Tumor Syndrome*) con posterioridad a la detección de una variante patogénica en este gen. Debido a la evolución clínica de uno de los cinco pacientes con diagnóstico inicial de DCMO (aparición de sobrecrecimiento lipomatoso), éste fue reclasificado como síndrome CLOVES. Por último, el paciente que fue remitido como macrocefalia y discapacidad intelectual, fue englobado dentro del grupo de pacientes con SKS con posterioridad a la detección de una variante patogénica en *mTOR*.

Todos los resultados que se presentarán a continuación hacen alusión al diagnóstico final establecido durante el trascurso de este proyecto. En los casos con diagnóstico modificado por motivo de sus resultados moleculares (cuatro SKS y un PHTS), se hará mención expreso de ello utilizando el término *reclasificado molecularmente*.

4.2 Desarrollo tecnológico

4.2.1 Panel Mosaicos y panel MALVA

El desarrollo tecnológico llevado a cabo en esta tesis se hizo gracias al diseño y utilización del panel de genes Mosaicos, así como al desarrollo de un protocolo bioinformático para la detección de mosaicos bajos.

Mediante el panel Mosaicos se estudiaron 62 de los 96 pacientes incluidos en la cohorte total, los cuales fueron utilizados para estimar los datos de cobertura media de lecturas de NGS obtenidas, así como para comparar el número de variantes obtenidas mediante el uso del protocolo bioinformático para variantes constitutivas o en mosaico.

Para hacer la estimación de coberturas, se tuvieron en cuenta las muestras de los 62 pacientes incluidos en el panel, que incluían 62 muestras de ADN procedentes de linfocitos de sangre periférica, 29 de saliva, y 41 de tejido afecto. Se realizó un estudio de la distribución de la mediana de la cobertura a distintos niveles:

1. Sin discriminar: distribución de la mediana de la cobertura en las 132 muestras de pacientes secuenciadas en el panel Mosaicos (Tabla 11).

Tabla 11: Resultados de la mediana de cobertura y cuartiles Q1 y Q3 de los datos de NGS obtenidos de los pacientes incluidos en el Panel Mosaicos, sin discriminar por tipo de muestra. N = 132 muestras.

Q1	MEDIANA	Q3
430,16	571,85	753,28

2. Discriminando por tipo de muestra: distribución de la mediana de la cobertura para los 3 tipos de muestra (Sangre, Saliva, Tejido) (Tabla 12).

Tabla 12: Resultados de la mediana de cobertura y cuartiles Q1 y Q3 de los datos de NGS obtenidos de los pacientes incluidos en el Panel Mosaicos discriminando por tipo de muestra (sangre, saliva y tejido afecto).

Tipo de muestra	Número muestras	Q1	Mediana	Q3
Sangre	62	544,18	628,45	771,33
Saliva	29	338,72	467,23	730,81
Tejido	41	227,1	517,16	675,88

La mediana de cobertura obtenida para todos los tipos de muestra en conjunto fue de 571,85x (Tabla 11). Cuando se discrimina por tipo de muestra, la mediana de cobertura tiene unos valores similares, aunque sí se pudo observar que fue mayor en el caso de las muestras de sangre, que además presentaban una menor variabilidad (Tabla 12). En las muestras de saliva y tejido esta variabilidad era mayor, probablemente debido a la variabilidad propia de este tipo de muestras (diferentes tejidos). Aunque el número de lecturas crudas (*raw*) por experimentos se corresponde con lo especificado por la casa comercial para el tipo de cartucho e instrumento utilizados, la mediana de cobertura obtenida tras el procesamiento bioinformático (571x) fue inferior a la cobertura esperada en el diseño experimental (1000x), debido a una infraestimación inicial del porcentaje de duplicados de PCR generados por el instrumento de lectura utilizado (NextSeq500). Estos duplicados son bioinformáticamente descartados y no computan en la estimación de la cobertura final.

Por otro lado, debido al propio diseño de los protocolos bioinformáticos, el número de variantes anotadas para cada muestra fue considerablemente más elevado con el protocolo para detección de mosaicos, tanto sin discriminar por tipo de muestra, como discriminando (Figura 11), haciendo imprescindible una mejora posterior del filtrado de variantes (predictores, literatura científica, etc.) para obtener un número abordable de candidatas en una posterior validación eficiente por medio de técnicas equivalentes (Sanger, pirosecuenciación y ddPCR). Gracias a la implementación del protocolo para variantes en mosaicos, se detectó la variante causal en 24 de los 47 (51%) pacientes con diagnóstico molecular positivo, la cual no fue detectada mediante el protocolo para variantes constitutivas (Tabla Anexa 2). Este último protocolo detectó las variantes cuando presentaban más de 20% de lecturas de NGS.

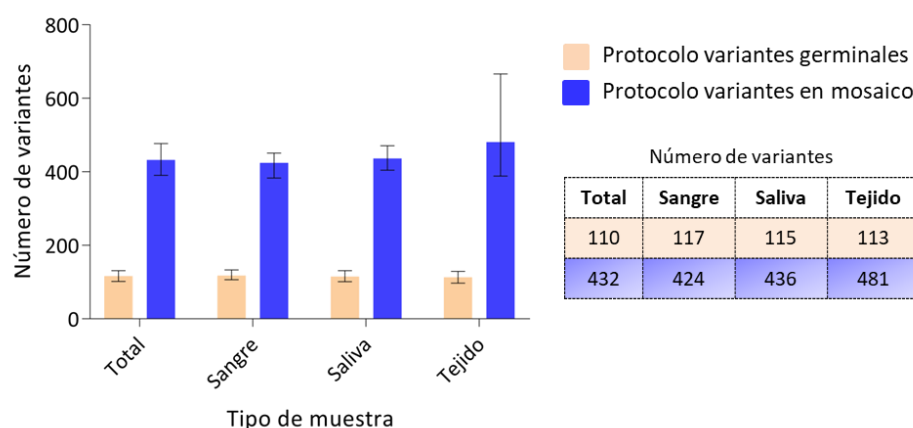


Figura 11: Mediana y cuartiles Q1 y Q3 del número de variantes obtenidas con la utilización del panel Mosaicos y el protocolo bioinformático para variantes constitutivas (naranja) o en mosaico (azul). Se ha calculado la mediana para el total de las muestras sin discriminar por tipo, así como discriminado entre sangre, saliva y tejido.

Con los datos obtenidos con el panel Mosaicos sobre los parámetros ya comentados de cobertura y número de variantes detectadas, así como la capacidad de discriminación de variantes y eficiencia diagnóstica, que se comentarán más adelante, se llevó a cabo el desarrollo posterior de un panel ampliado de 112 genes asociados a malformaciones vasculares y sobrecrecimiento, el panel MALVA. Este panel fue utilizado para analizar las muestras de la cohorte de estudio obtenidas con posterioridad a Febrero de 2016, detectándose variantes patogénicas en el gen *PIK3CA* en los pacientes TSR042, TSR058, TSR076, TSR078, TSR079, TSR087, TSR088, TSR089, TSR090, TSR092 y TSR094 (Tabla 13 y Tabla Anexa 2). La mediana de cobertura obtenida finalmente para el panel fue de 504,09x, para un pool de 30 muestras por carrera. El porcentaje de duplicados de PCR para este panel se redujo

hasta el 0,9%. Este panel de genes ya está validado e incluido en la cartera de servicios del diagnóstico asistencial del INGEMM.

Con los resultados obtenidos con el panel Mosaicos, así como posteriormente con el panel MALVA, se estima una profundidad de lectura recomendable de 500x para el estudio de variantes presentes en forma de mosaico somático.

4.2.2 Variantes localizadas en regiones de alta homología

El gen *PIK3CA* comparte una homología de más del 95% entre la región que abarca desde el exón 10 al 14 de su secuencia con una región del genoma localizada en el cromosoma 22. Previamente al estudio por NGS de la cohorte de pacientes, se realizó un análisis por secuenciación Sanger de 24 de estos pacientes, que determinó la presencia de dos variantes consecutivas en heterocigosis en el exón 10 de *PIK3CA* (c.1634A>C;p.Glu545Ala y c.1658_1659GT>C; p.S553fs*7) en todos los pacientes estudiados, así como tres variantes en el exón 12 (c.1837G>A; p.Gly613Ser, c.1850G>A;p.Arg617Gln y c.1876G>A;p.Asp626Asn) y dos en el exón 14 (c.2038G>C;p.Val680Leu y c.2155C>G;p.Leu719Val). Se realizó un BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) entre la secuencia de *PIK3CA* de los exones 10 al 14 que se obtuvo mediante secuenciación Sanger y el genoma humano, y se vio que estas variantes correspondían a los nucleótidos de la región de alta homología con *PIK3CA* (Figura 12).

Cuando posteriormente se realizaron los estudios de estos mismos pacientes mediante NGS para llevar a cabo la búsqueda de variantes causales en mosaico, no se detectaron las variantes correspondientes a la amplificación de la región de homología, lo que demuestra un correcto posicionamiento de las sondas de amplificación por NGS, que son específicas para *PIK3CA* y no para la región de homología en el cromosoma 22. Aun así, en caso de detectar variantes en esta región de *PIK3CA*, se recomienda realizar estudios de validación que permitan amplificar únicamente dicho gen.

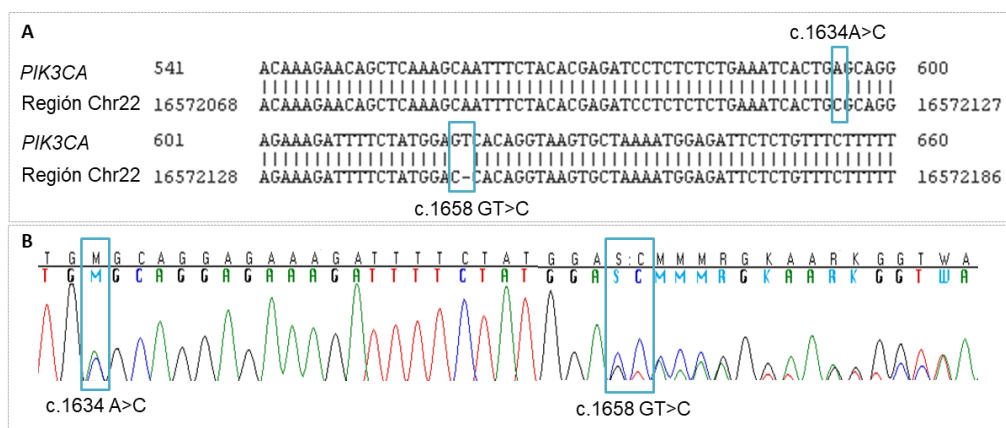


Figura 12: Resultados de un BLAST (A) y secuenciación Sanger (B) del exón 10 de *PIK3CA* mostrando los nucleótidos que varían en la región de alta homología. Los recuadros azules en B muestran la posición de las dos variantes que se detectan en el exón 10 de *PIK3CA* cuando se realiza secuenciación Sanger utilizando el ADN de los pacientes directamente, que coinciden con los nucleótidos de la secuencia de la región de alta homología, como se observa en el BLAST representado en A.

En este sentido, los estudios de NGS realizados durante esta tesis identificaron seis variantes en *PIK3CA* (c.1624G>A;p.Glu542Lys, c.1633G>A;p.Glu545Lys, c.1634A>G;p.Glu545Gly, c.1637A>T;p.Gln546Leu, c.1638G>T;p.Gln546His, c.2176G>A;p.Glu726Lys) localizadas entre el exón 10 y el 14 en diez pacientes. Para confirmar que dichas variantes se encontraban en *PIK3CA*, se validaron por pirosecuenciación y/o ddPCR utilizando como molde el producto obtenido de la amplificación previa por *Long-Range* PCR (LR-PCR) y además se comparó con los resultados obtenidos utilizando el ADN genómico (gDNA) directamente para determinar si los porcentajes variaban. Los resultados obtenidos indicaron que las variantes se encontraban en el gen *PIK3CA*. En el caso de pirosecuenciación, cuando se utiliza el producto de la LR-PCR el porcentaje se asemejaba más al obtenido mediante NGS. Un ejemplo de esto es el paciente TSR062, en el cual se detectó la variante *PIK3CA*:c.1624G>A;p.Glu542Lys en un 28% de las lecturas de NGS, y la validación por pirosecuenciación utilizando gDNA la detectó en un 22,5%, mientras que utilizando producto de la LR-PCR se detectaba en un 30%. Asimismo, en el caso del paciente TSR022, la variante *PIK3CA*:c.1634A>G;p.Glu545Gly con NGS se detectó en un 11% de las lecturas, con pirosecuenciación utilizando gDNA en un 15% y con LR-PCR en un 11,2%. Sin embargo, en el caso de ddPCR no se observan diferencias utilizando el ADN genómico o el producto de LR-PCR, ya que por ejemplo, en el paciente TSR051 con la técnica de NGS se detectó la variante *PIK3CA*:c.1624G>A;p.Glu542Lys en un 3% de las lecturas, mientras que con ddPCR se detectó en un 5,5% utilizando gDNA y un 5,9% con LR-PCR; y en el paciente TSR018 se detectó la variante *PIK3CA*:c.2176G>A;p.Glu726Lys en un 1% de las lecturas en muestra de ADN de sangre con NGS, y con ddPCR en un 1,48% y 1,3%, con gDNA y

LR-PCR respectivamente. El hecho de no haber diferencias con la técnica de ddPCR puede deberse a que las sondas diseñadas por la casa comercial para la realización de esta técnica abarquen regiones de *PIK3CA* que la diferencien de la región de alta homología, no amplificando por tanto dicha región. Utilizar nucleótidos que diferencien entre *PIK3CA* y la región con alta homología es una buena opción, y en este trabajo también se ha podido comprobar utilizando en pirosecuenciación los oligonucleótidos diseñados por Baker (118) para diferenciar entre estas dos regiones y efectivamente se amplificaban correctamente, permitiendo discriminar las variantes localizadas en *PIK3CA*.

Por otro lado, la eficiencia de la ddPCR no era muy buena cuando se utilizaba el producto de LR-PCR, pudiendo deberse a que los reactivos interfirieran con la técnica.

4.3 Resultados moleculares

El estudio molecular en este trabajo, se realizó en 85 de los 96 pacientes, de los cuales se disponía de algún tipo de muestra de ADN, incluyéndose 26 MCAP, 3 MCAP/CLAPO, 20 CLOVES, 2 CLOVES/MCAP, 7 macrodactilias, 18 PROS, 4 DCMO, 4 pacientes posteriormente reclasificados molecularmente como SKS y 1 paciente posteriormente reclasificado como PHTS. El rendimiento diagnóstico del estudio molecular fue del 55,3%, dado que se encontró una variante patogénica o probablemente patogénica en 47 de los 85 pacientes estudiados molecularmente (Figura 13). La distribución de estos 47 pacientes en los que se encontró un defecto molecular fue la siguiente: 15 MCAP, 3 MCAP/CLAPO, 12 CLOVES, 2 CLOVES/MCAP, 4 macrodactilia aislada, 5 PROS sin especificar, 1 DCMO, 4 pacientes reclasificados molecularmente como SKS y 1 paciente reclasificado molecularmente como PHTS.

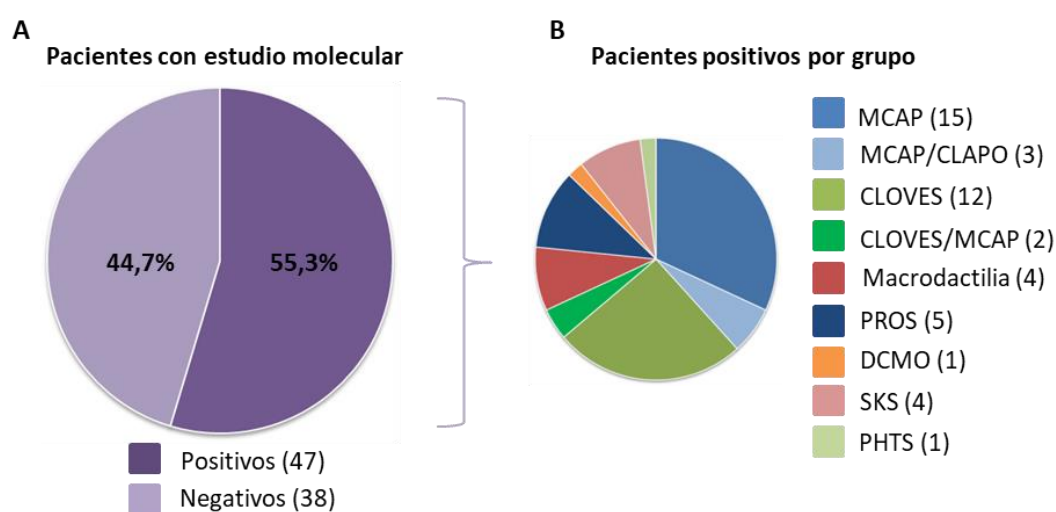


Figura 13: Número total de pacientes estudiados molecularmente. A. 85 pacientes estudiados, de los cuales en un 55,3% se encontró el defecto molecular. **B.** Distribución clínica de los pacientes con estudio molecular positivo.

El porcentaje de pacientes con diagnóstico molecular positivo en cada patología estudiada ha sido: 57,7% (15/26) para MCAP, 60% (12/20) para CLOVES, 57,1% (4/7) para macrodactilia aislada, 27,8% (5/18) para pacientes con diagnóstico general de PROS, 25% (1/3) para DCMO, 100% para pacientes con fenotipos solapantes MCAP/CLAPO (3/3), y CLOVES/MCAP (2/2), así como para pacientes reclasificados molecularmente como SKS (4/4) y el paciente reclasificado molecularmente como PHTS (1/1). Al tratarse de patologías causadas por mosaicismo somático, se comparó los porcentajes de pacientes con diagnóstico positivo frente a los porcentajes de pacientes con diagnóstico positivo únicamente teniendo en cuenta aquellos de los que disponíamos de muestra de tejido afecto (Figura 14), con el fin de determinar si los porcentajes de diagnóstico aumentaban. Los resultados obtenidos fueron: 69,2% (9/13) en el caso de pacientes MCAP, 85,7% (12/14) en el caso de CLOVES, 80% (4/5) en el caso de macrodactilia, 50% en pacientes con diagnóstico general de PROS, y 33,3% en el caso de DCMO. Esta comparación no es aplicable a SKS y PHTS dado que las mutaciones en estas patologías suelen darse de forma constitutiva.

Todas las patologías mostraron un aumento en el porcentaje de diagnóstico cuando se disponía de tejido afecto. Los casos más claros fueron aquellos con síndrome CLOVES y macrodactilia aislada, en los cuales el porcentaje diagnóstico aumentaba desde el 60% hasta más del 80%. En los pacientes con MCAP, este incremento fue de un 10%, y además, en el 38,5% (10/26) fue posible detectar la variante causal en muestra de sangre y/o saliva por encima del 5% de las lecturas de NGS. El rango del 5% fue establecido al ser capaces de discriminar entre variante causal y artefacto de la técnica sin necesidad de disponer de muestra de tejido afecto para contrastar.

En cuanto al grupo de pacientes con diagnóstico de DCMO, la causa molecular de la patología era desconocida, y dado que el número de pacientes que se incluyeron en el estudio fue bajo, no podemos sacar conclusiones en cuanto a las variaciones en el porcentaje de diagnóstico molecular.

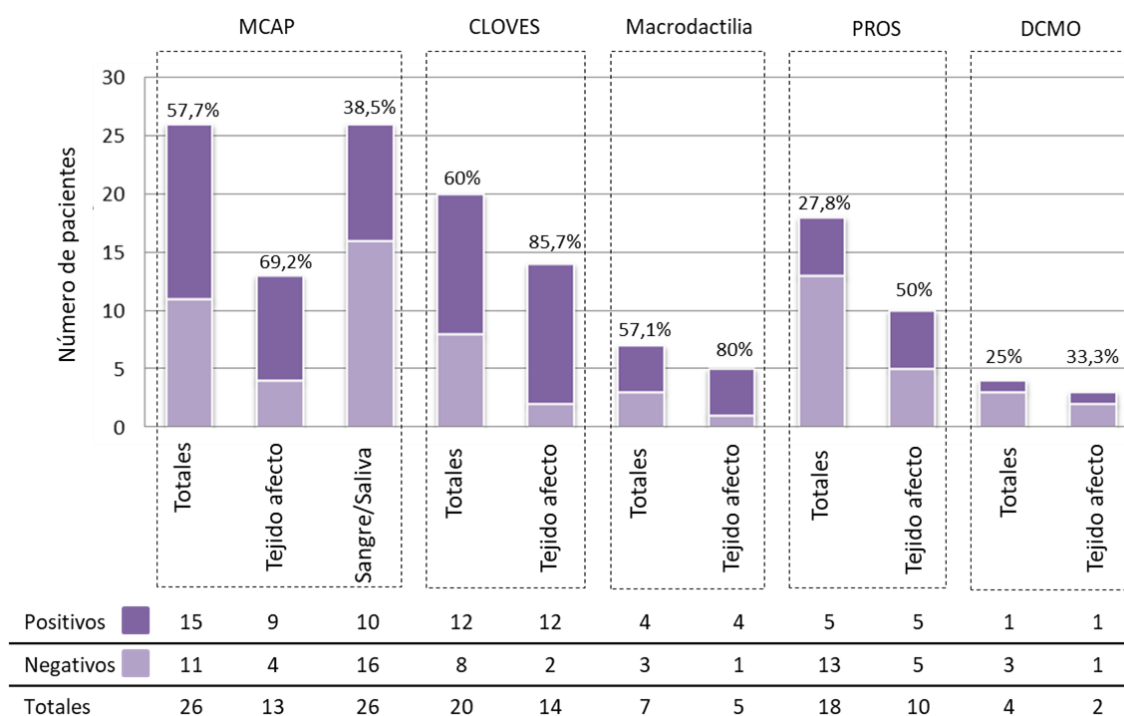


Figura 14: Ratio de diagnóstico molecular positivo presentado por grupo de patología. Por patología, la primera columna muestra el total de pacientes, la segunda columna sólo los pacientes con muestra de tejido afecto y la tercera columna muestra los pacientes con muestra de sangre y/o saliva y contando como positivos aquellos que presentan la variante en más del 5% de sus lecturas de NGS, sólo observado para MCAP. La cifra sobre cada columna refleja el porcentaje de pacientes con diagnóstico molecular positivo dentro de cada subgrupo. No se representan los ratios correspondientes a los pacientes con características solapantes (MCAP/CLAPO, CLOVES/MCAP) ni de los pacientes con diagnóstico molecular de SKS y PHTS por tener un ratio de diagnóstico del 100%. No se incluye en la figura la muestra de sangre con mutación en *PIK3CA* en un paciente con CLOVES, debido a que su porcentaje de lecturas es inferior al 5%. Esto mismo aplica para algunos casos MCAP.

4.3.1 Descripción de las variantes causales detectadas

Cuarenta y siete de los 85 pacientes (55,3%) estudiados molecularmente mostraron una variante patogénica o probablemente patogénica, presente en porcentajes distintos en las diferentes muestras analizadas por paciente (Tabla 13). El porcentaje de variante alternativa en los diferentes tejidos del paciente que se estudiaron se calculó como el número de lecturas del alelo alternativo obtenidos tras la realización de cada uno de los paneles de secuenciación masiva frente al número de lecturas totales. Las variantes identificadas fueron validadas mediante las técnicas de secuenciación Sanger (cuando se detectaron en lecturas por encima del 15%), pirosecuenciación (entre el 5 y el 15%), y ddPCR (por debajo del 5%). La pirosecuenciación y la ddPCR fueron utilizadas redundantemente en diversas muestras como método de validación y estimación de sensibilidad y fiabilidad. En los casos en los que se

disponía de las muestras de ADN de los padres se realizó el estudio de cosegregación para descartar la presencia de las variantes detectadas en el paciente.

Todas las variantes causales detectadas se encontraron en cuatro genes incluidos en la ruta celular PI3K/AKT/mTOR. El 91,4% (43/47) de los pacientes estudiados presentó una variante en el gen *PIK3CA*, y de estos, 14 tenían diagnóstico de MCAP, 3 de MCAP/CLAPO, 12 de CLOVES, 2 de MCAP/CLOVES, 4 de macrodactilia aislada, 5 de PROS y 1 de DCMO. Un paciente con diagnóstico de MCAP presentó una variante no descrita previamente en el gen *AKT3*. Cuatro pacientes fueron reclasificados molecularmente con diagnóstico de SKS por presentar una variante en el gen *mTOR*. Finalmente, un paciente presentó una variante en *PTEN*, por lo que fue reclasificado molecularmente como PHTS.

En trece de los 14 (93%) pacientes con diagnóstico de MCAP en los que fue identificada una variante patogénica (3/14) o probablemente patogénica (11/14) en el gen *PIK3CA*, la variante también fue detectada en muestra de ADN obtenido de sangre y/o saliva, además de en muestra de ADN de tejido afecto; uno de estos pacientes (TSR031) presentó la variante en heterocigosis tanto en muestra de ADN de sangre como de tejido afecto. Por otro lado, sólo uno de los 14 pacientes (TSR058) con variante en *PIK3CA* presentó la variante únicamente en tejido afecto y no en sangre. Sin tener en cuenta el paciente heterocigoto para la variante identificada, los rangos de lecturas de NGS detectados van desde un 1% a un 13% en sangre, de un 4% a un 36% en saliva y de un 3% a un 42% en tejido afecto. Asimismo, el porcentaje más alto de variante en muestra tanto de sangre como de saliva, se ha detectado en el paciente TSR009, con un 13% y un 36% respectivamente. No disponíamos de muestra de tejido afecto de dicho paciente.

El paciente TSR028 presentó un número bajo de lecturas de NGS del alelo alternativo, haciendo difícil la distinción entre una posible variante causal o un artefacto de la técnica. Sin embargo, las técnicas de validación empleadas, pirosecuenciación y ddPCR, confirmaron la presencia de esta variante.

Uno de los 15 pacientes MCAP (TSR041) presentó una mutación en el gen *AKT3*. Dicha variante está presente en un 1% de las lecturas de NGS en muestra de sangre, 21% en saliva y 24% en piel. La variante no estaba descrita previamente en síndromes relacionados con el desarrollo ni asociada a neoplasias.

Los tres pacientes con solapamiento fenotípico MCAP/CLAPO presentaron una variante clasificada como patogénica en *PIK3CA*. Dos de ellos (TSR026 y TSR029) presentaron la variante en ADN extraído de sangre, saliva, y tejido afecto, mientras que el tercero (TSR030) en saliva y tejido afecto. Los porcentajes de lecturas fueron variables en los tres casos, siendo en muestra de tejido afecto en torno al 30%.

Doce pacientes con diagnóstico de síndrome CLOVES presentaron variantes patogénicas (10/12) o probablemente patogénicas (2/12) en forma de mosaico en *PIK3CA*. Los porcentajes de lecturas del alelo alternativo de NGS en muestra de tejido afecto estaban entre el 2,3% y el 38%, siendo el porcentaje mayor identificado en el paciente TSR035, el cual además presentó la variante en ADN procedente de linfocitos de sangre periférica en un 2% de las lecturas de NGS. Ningún otro paciente con diagnóstico de síndrome CLOVES presentó la variante en sangre o saliva.

Los dos pacientes (TSR037 y TSR053) que presentaban solapamiento fenotípico CLOVES/MCAP y variantes patogénicas en *PIK3CA*, presentaron porcentajes bajos de mosaicismo en tejido (10% y 7% respectivamente). Asimismo, se identificó la variante correspondiente en cada caso, en sangre (1%) del paciente TSR037, y saliva (7%) del paciente TSR053.

Cuatro pacientes con macrodactilia aislada presentaron variantes patogénicas en *PIK3CA* únicamente en ADN procedente de muestra de tejido afecto. Todas las variantes detectadas estaban presentes en torno al 20% de lecturas de NGS.

De los cinco pacientes con variante probablemente patogénica detectada en *PIK3CA* y diagnóstico de PROS en general, se disponía de muestras de ADN procedente de sangre, saliva y tejido afecto de todos ellos, salvo de uno (TSR073) del que se no se disponía de saliva. No se detectó la variante en sangre en ninguno de los pacientes, pero sí en saliva en todos los cuatro de los que se tenía muestra (siempre con un porcentaje en torno al 2,7%). En el caso de muestras de tejido afecto, el rango de lecturas de NGS fue desde el 5% al 13%. Los porcentajes obtenidos por pirosecuenciación no pudieron ser cuantificados por dificultades propias de la técnica en los pacientes TSR089, TSR077, y TSR078. Sin embargo, el análisis visual de los pirogramas resultantes mostró la presencia de la variante.

Por último, se identificó una variante en *PIK3CA* en un paciente (TSR076) con diagnóstico de DCMO. La variante estaba presente en el 5% de las lecturas de NGS en muestra de saliva y 10% en muestra de tejido afecto.

Por otro lado, cuatro pacientes reclasificados molecularmente como SKS presentaron una variante patogénica o probablemente patogénica en el gen *mTOR*. En tres de los pacientes (TSR015, TSR016 y OGS771) la variante se detectó en heterocigosis, mientras que en el cuarto (TSR023) se identificó en mosaico en todos sus tejidos estudiados (2% en sangre, 11% en saliva y aproximadamente 20% en piel). El paciente TSR021 reclasificado con diagnóstico de PHTS presentó una variante patogénica en *PTEN* en el 26,7% de las lecturas de NGS en muestra de ADN obtenido de sangre periférica.

Veintiuna de las 23 variantes detectadas en *PIK3CA*, así como dos de las detectadas en *mTOR* y la variante en *PTEN*, estaban descritas previamente en la base de datos de variantes somáticas descritas en pacientes con cáncer (COSMIC). Todas las variantes en *PIK3CA* salvo las identificadas en los pacientes TSR007 (*PIK3CA*:c.2726T>G;p.Phe909Cys) y TSR071 (*PIK3CA*:c.331A>G;p.Lys111Glu) habían sido descritas previamente en pacientes del espectro PROS. Las variantes identificadas en *mTOR* habían sido descritas en pacientes con SKS, y la variante en *PTEN* en pacientes con PHTS. Asimismo, las variantes identificadas no estaban descritas en bases de datos de población control, y en el caso de estarlo (*PIK3CA*: c.3140A>G;p.His1047Arg) lo estaban en porcentajes por debajo del 1%.

Catorce de las variantes detectadas en *PIK3CA* y dos en *mTOR* tenían estudios que demostraban mecanismos de ganancia de función (GOF), al contrario que la variante detectada en *PTEN*, de la cual había estudios funcionales que demostraban su efecto de pérdida de función.

La clasificación de variantes obtenida según la clasificación propuesta por el Colegio Americano de Genética Médica y genómica en consenso con la asociación americana de patología molecular (121), determinó que la variante identificada era patogénica en 26 de los 47 pacientes (55,3%), probablemente patogénica en 20 de los 47 (42,6%), y de significado incierto en uno de ellos (TSR041) (2,1%).

Tabla 13: Variantes causales identificadas en la cohorte total de pacientes.

Paciente	Gen	Variante gDNA	Variante cDNA	Variante aminoácido	Tipo muestra	% Lecturas NGS	Nº Lecturas NGS	Sanger	Pirosec.	ddPCR	Padres	BD	COSMIC	Estudio funcional literatura	Fenotipo PROS asociado	Clasif. ACMG
Macrocefalia-Malformación Capilar																
TSR028	PIK3CA	Chr3:178916957G>C	c.344G>C	p.Arg115Pro	Sangre	3%	[454,12]	-	3,60%	2%	-	-	-	-	MCAP (89), Macroductilia (33, 42)	Patogénica
					Saliva	12%	[14,2]	-	Sí	-	Neg.	-	-	-	-	
TSR009	PIK3CA	Chr3:178922364G>A	c.1133G>A	p.Cys378Tyr	Sangre	13%	[245,37]	-	16,40%	-	-	-	COSM 1041479	-	MCAP (20, 42), (65, 89)), CLOVES (65)	Prob. patogénica
					Saliva	36%	[171,97]	-	34,80%	-	Neg.	-	-	-	-	
TSR087	PIK3CA	Chr3:178936096G>T	c.1638G>T	p.Gln546His	Sangre	4%	[211, 8]	-	Sí	-	-	-	COSM588 1065	-	No MCAP (65, 89)	Prob. patogénica
					Mucosa bucal1	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-	
					Mucosa bucal 2	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-	
TSR018	PIK3CA	Chr3:178938934G>A	c.2176G>A	p.Glu726Lys	Sangre	1%	[600,4]	-	-	1%	-	-	COSM873 06	GOF (122)	MCAP (20, 89) (65), CLOVES (65)	Patogénica
					Saliva	14%	[581,98]	-	Sí	14%	Neg.	-	-	-	-	
TSR020	PIK3CA	Chr3:178938934G>A	c.2176G>A	p.Glu726Lys	Sangre	4%	[417,17]	-	Sí	2,10%	Neg.	-	COSM873 06	GOF (122)	MCAP (20, 89), (65), CLOVES (65)	Prob. patogénica
TSR056	PIK3CA	Chr3:178938934G>A	c.2176G>A	p.Glu726Lys	Sangre	Neg.	Neg.	-	Neg.	Neg.	-	-	COSM873 06	GOF (122)	MCAP (20, 65, 89), CLOVES (65)	Prob. patogénica
					Saliva	-	-	-	Sí	6%	Neg.	-	-	-	-	
					Tejido	9%	[1044,99]	-	Sí	7%	-	-	-	-	-	
TSR094	PIK3CA	Chr3:178938934G>A	c.2176G>A	p.Glu726Lys	Saliva	6%	[2411, 149]	-	2%	-	-	-	COSM873 06	GOF (122)	MCAP (20, 65, 89), CLOVES (65)	Prob. patogénica
TSR007	PIK3CA	Chr3:178947851T>G	c.2726T>G	p.Phe909Cys	Sangre	5%	[556,29]	-	5,70%	-	-	-	COSM441 1008	-	-	Prob. patogénica
					Saliva	-	-	-	8,60%	-	Neg.	-	-	-	-	
					Tejido	-	-	Sí	42,30%	-	-	-	-	-	-	

TSR088	PIK3CA	Chr3:178948044A>G	c.2816A>G	p.Asp939Gly	Sangre Mucosa bucal Piel	7% 28% -	[528, 40] [322, 125] -	Sí Sí -	2,20% 29% -	- - -	Neg.	-	COSM104 1513	-	MCAP (89)	Prob. patogénica
TSR014	PIK3CA	Chr3:178952006T>C	c.3061T>C	p.Tyr1021His	Sangre Saliva Piel	Neg. 5% 41%	Neg. [459,26] [33,23]	- - -	1% 5,50% 16%	- - -	Neg.	-	COSM174 44	-	MCAP (89), CLOVES (65)	Prob. patogénica
TSR059	PIK3CA	Chr3:178952007A>G	c.3062A>G	p.Tyr1021Cys	Sangre	5%	[620,36]	-	8,60%	-	Neg.	-	COSM124 61	-	MCAP (20, 42, 65, 89)	Prob. patogénica
TSR031	PIK3CA	Chr3:178952049C>T	c.3104C>T	p.Ala1035Val	Sangre Tejido	42% 55%	[167,119] [136,166]	Sí Sí	50% 53,40%	- -	Neg	-	COSM 17445	-	MCAP (20, 42, 65, 89), CLOVES (65)	Prob. patogénica
TSR019	PIK3CA	Chr3:178952074G>A	c.3129G>A	p.Met1043Ile	Sangre Saliva Tejido TMB Cels TMB HV1 HV2	Neg. NS 3% - - 1% 4%	Neg. - [661,20] - - [355,5] [246,10]	- - -	Neg. Neg. <1% 15% - Neg <1%	1,50% 4% 3,90% - 40% 3% 5,50%	Neg.	<0. 000 1	COSM293 13	GOF (30)	MCAP (20, 42, 65, 89, 123)	Prob. patogénica
TSR058	PIK3CA	Chr3:178952085A>G	c.3140A>G	p.His1047Arg	Sangre Tejido	Neg. 8%	Neg. [251, 23]	- -	Neg. 19%	- -	- -	<0. 000 1	COSM775	GOF (30, 124)	Todo el espectro PROS (9, 32, 33, 42, 65, 75)	Patogénica
TSR041	AKT3	Chr1:243727107 C>T	c.863C>T	p.Thr288Ile	Sangre Saliva Tejido	1% 21% 24%	[770,5] [183,49] [187,59]	Neg. Sí Sí	- 13% 19%	- - -	Neg.	-	-	-	-	VUS
Solapamiento Macrocefalia-Malformación/Síndrome CLAPO																
TSR030	PIK3CA	Chr3:178917478G>A	c.353G>A	p.Gly118Asp	Sangre Saliva Tejido	0% 30% 27%	[420,2] [176, 76] [177, 63]	Neg. Sí Sí	- 27,40% 22,20%	- - -	Neg.	-	COSM751	GOF (125, 126)	MCAP, CLOVES (65, 89)	Patogénica
TSR029	PIK3CA	Chr3:178928079G>A	c.1357G>A	p.Glu453Lys	Sangre Saliva Tumor MV en riñón Piel sana	7% 7% 45% 33% 8%	[444,34] [281,21] [143,119] [75, 37] [229, 20]	- - - - -	6,60% 0% 30,10% 30,10%	5,50% 7,90% 42% 39%	Neg.	-	COSM 12584	GOF (124) (127)	MCAP (20, 42, 65, 89)), CLOVES (65, 89)	Patogénica

TSR026	PIK3CA	Chr3: 178947865G>A	c.2740G>A	p.Gly914Arg	Sangre	2%	[725,16]		2,40%			-	COSM320 5661	GOF (20)	MCAP (20, 42, 89)), CLOVES (65)	Patogénica
					Saliva	10%	[241,34]	-	5,90%	-	Neg.					
					Tejido	34%	[148,85]		27,80%							
Síndrome CLOVES																
TSR071	PIK3CA	Chr3:178916854A>G	c.331A>G	p.Lys111Glu	Sangre	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	-	-	-	COSM135 70	GOF (126)	-	Prob. patogénica
TSR043	PIK3CA	Chr3:178927980T>C	c.1258T>C	p.Cys420Arg	Sangre	Neg.	Neg.		Neg.	Neg.		-	COSM757	GOF (30, 128)	CLOVES (42, 65, 89), macroduct ilia (65)	Patogénica
					Saliva	Neg.	Neg.	-	Neg.	Neg.	Neg.					
TSR035	PIK3CA	Chr3:178928079G>A	c.1357G>A	p.Glu453Lys	Sangre	2%	[852,19]	Neg.	Neg.	1%		-	COSM 12584	GOF (124, 127)	MCAP (20, 42, 65, 89)), CLOVES (65, 89)	Patogénica
					Saliva	0%	[643,0]	Neg.	Neg.	0,40%						
					Malf. Linfática	36%	[252,145]	Sí	28,60%	-	Neg.					
					Lipoma	36%	[172,99]	Sí	14,50%	32%						
TSR039	PIK3CA	Chr3:178928079G>A	c.1357G>A	p.Glu453Lys	Sangre	Neg.	Neg.		Neg.	Neg.		-	COSM 12584	GOF (124, 127)	MCAP (20, 42, 65, 89)), CLOVES (65, 89)	Patogénica
					Saliva	Neg.	Neg.	-	Neg.	Neg.	Neg.					
TSR042	PIK3CA	Chr3:178928079G>A	c.1357G>A	p.Glu453Lys	Piel	4%	[275,13]		Neg.	5%		-	COSM 12584	GOF (124, 127)	MCAP (20, 42, 65, 89)), CLOVES (65, 89)	Patogénica
					Sangre	Neg.	Neg.	-	Neg.	Neg.	Neg.					
TSR051	PIK3CA	Chr3:178936082G>A	c.1624G>A	p.Glu542Lys	Sangre	Neg.	Neg.		Neg.	Neg.		-	COMS760	GOF (30, 124)	Todo el espectro PROS (9, 42, 65, 73, 75, 89, 129)	Patogénica
					Tejido1	3%	[37,1]	-	7,70%	5,50%						
TSR062	PIK3CA	Chr3:178936082G>A	c.1624G>A	p.Glu542Lys	Tejido2	Neg.	Neg.		8,10%	Neg.		-	COMS760	GOF (30, 124)	Todo el espectro PROS (9, 42, 65, 73, 75, 89, 129)	Patogénica
					Sangre	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.					
					Tejido	28%	[674,266]	Sí	22,50%	16%						
					Sangre	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.					

TSR022	PIK3CA	Chr3:178936092A>G	c.1634A>G	p.Glu545Gly	Sangre Saliva	Neg Neg	Neg Neg	-	Neg Neg	-	Padre neg.	-	COSM764	GOF (30)	No MCAP (89), Nevus epidérmico(79)	Patogénica
TSR063	PIK3CA	Chr3:178952084C>T	c.3139C>T	p.His1047Tyr	Sangre Tejido	Neg 10%	Neg [57,6]	Neg Neg	Neg -	Neg 3,40%	Neg	-	COSM774	GOF (30, 124)	MCAP (20, 42, 65, 89)	Patogénica
TSR013	PIK3CA	Chr3:178952085A>G	c.3140A>G	p.His1047Arg	Sangre Saliva	Neg Neg	-	-	-	Neg Neg	Neg.	<0.0001	COSM775	GOF (30, 124)	Todo el espectro PROS (9, 32, 33, 42, 65, 75)	Patogénica
TSR033	PIK3CA	Chr3:178952085A>G	c.3140A>G	p.His1047Arg	Sangre Saliva	Neg. Neg.	Neg. Neg.	Neg. Neg.	Neg. Neg.	-	-	<0.0001	COSM775	GOF (30, 124)	Todo el espectro PROS (9, 32, 33, 42, 65, 75)	Prob. patogénica
TSR036	PIK3CA	Chr3:178952085A>G	c.3140A>G	p.His1047Arg	Sangre Saliva	Neg. Neg.	Neg. Neg.	-	Neg. Neg.	Neg. Neg.	Neg.	<0.0001	COSM775	GOF (30, 124)	Todo el espectro PROS (9, 32, 33, 42, 65, 75)	Patogénica
Solapamiento Síndrome CLOVES/Macrocefalia-Malformación Capilar																
TSR037	PIK3CA	Chr3:178922363T>C	c.1132T>C	p.Cys378Arg	Sangre FFPE	1% 10%	[578,6] [60, 6]	-	- Sí	-	Neg.	-	COSM756	GOF (130)	-	Patogénica
TSR053	PIK3CA	Chr3:178928079G>A	c.1357G>A	p.Glu453Lys	Saliva Tejido	7% 7%	[399,30] [485,36]	-	Neg. 5%	5,90% 13%	Neg.	-	COSM12584	GOF (124) (127)	MCAP (20, 42, 65, 89), CLOVES (65, 89)	Patogénica
Macrodactilia																
TSR070	PIK3CA	Chr3:178936091G>A	c.1633G>A	p.Glu545Lys	Sangre Tejido	Neg. -	Neg. -	-	Neg. Sí	Neg. 21%	Neg.	-	COSM763	GOF (30, 124)	Todo el espectro PROS (9, 42, 65, 73, 75, 89, 129))	Patogénica
TSR064	PIK3CA	Chr3:178952085A>G	c.3140A>G	p.His1047Arg	Sangre FFPE	Neg. 21%	Neg. [312, 44]	Neg. Sí	Neg. 24,20%	-	-	<0.0001	COSM775	GOF (30, 124)	Todo el espectro PROS (9, 32, 33, 42, 65, 75)	Patogénica

TSR090	PIK3CA	Chr3:178952085A>G	c.3140A>G	p.His1047Arg	Tejido	20%	[339, 86]	Sí	24,30%			<0.0001	COSM775	GOF (30, 124)	Todo el espectro PROS (9, 32, 33, 42, 65, 75)	Patogénica
					Cels.	-	-	Sí	45,70%	-	-					
TSR092	PIK3CA	Chr3:178952085A>G	c.3140A>G	p.His1047Arg	Sangre	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.			<0.0001	COSM775	GOF (30, 124)	Todo el espectro PROS (9, 32, 33, 42, 65, 75)	Patogénica
					Piel	27,90%	[573, 222]	Sí	26,10%	-	-					
PROS sin especificar																
TSR073	PIK3CA	Chr3:178916854G>A	c.241G>A	p.Glu81Lys	Sangre	Neg.	Neg.		Neg.				COSM219807	GOF (103)	MCAP (20, 42, 65, 89)	Prob. patogénica
					Tejido afecto	Neg.	Neg.		-							
					Tejido sano	Neg.	Neg.	-	-	-	-					
					Cels TA	Neg.	Neg.		Neg.							
					Cels TS	7%	[872, 61]		6,10%							
TSR089	PIK3CA	Chr3:178916957G>C	c.344G>C	p.Arg115Pro	Sangre	Neg.	[111, 1]		Neg.						MCAP (89),	Prob. patogénica
					Saliva	Neg.	[78, 0]		2,8%						Macroductilia (33, 42)	
					Tejido	8%	[65, 6]		3%							
TSR077	PIK3CA	Chr3:178922364G>A	c.1133G>A	p.Cys378Tyr	Sangre	Neg.	Neg		Neg.				COSM1041479	-	MCAP (20, 42), (65, 89)),	Prob. patogénica
					Saliva	2,70%	[527, 6]		Sí						CLOVES (65)	
					Tejido	5,20%	[190,7]		Sí							
TSR078	PIK3CA	Chr3:178916854A>T	c.1637A>T	p.Gln546Leu	Sangre	Neg.	Neg		Neg.				COSM25041	-	-	Prob. patogénica
					Saliva	2,70%	[370,26]	-	Sí							
					Tejido	13%	[125,12]		Sí							
TSR079	PIK3CA	Chr3:178928079G>A	c.1357G>A	p.Glu453Lys	Sangre	Neg.	[343,0]		Neg.				COSM12584	GOF (124, 127)	MCAP (20, 42, 65, 89)),	Patogénica
					Saliva	-	-		2,70%						CLOVES (65, 89)	
					Tejido	10%	[588, 63]		7,60%		Neg.					
DCMO																
TSR076	PIK3CA	Chr3:178916854G>A	c.241G>A	p.Glu81Lys	Sangre	Neg.	Neg.		Neg.				COSM219807	GOF (103)	MCAP (20, 42, 65, 89)	Prob. patogénica
					Saliva	5%	[662,33]	-	Sí							
					Tejido	10%	[79,9]		Sí							

Síndrome de Smith-Kingsmore - <i>mTOR</i> -														
TSR023	<i>mTOR</i>	Chr1:11217230G>A	c.4448G>A	p.Cys1483Tyr	Sangre	2%	[706,12]		2,90%					
					Saliva	11%	[301,39]		11,50%					
					Piel hiperp.	-	-	-	17,60%	Neg.	-	COSM 462615	GOF (131)	SKS (21, 132)
					Piel hipop.	28%	[188,76]		20,20%					Patogénica
OGS771	<i>mTOR</i>	Chr1:11190804G>A	c.5395G>A	p.Glu1799Lys	Sangre	46,80%	[144, 127]	Sí	-	-	Neg.	-	COSM 180789	SKS (133) (134, 135)
TSR015	<i>mTOR</i>	Chr1:11184612T>G	c.6605T>G	p.Phe2202Cys	Sangre	48%	[127, 140]	Sí	-	-	Neg.	-	-	Prob. patogénica
TSR016	<i>mTOR</i>	Chr1:11184612T>G	c.6605T>G	p.Phe2202Cys	Sangre	49%	[151, 156]	Sí	-	-	Neg.	-	-	Prob. patogénica
Trastornos relacionados con <i>PTEN</i>														
TSR021	<i>PTEN</i>	Chr10:89692904C>T	c.388C>T	p.Arg130*	Sangre	26,70%	[197,72]	Sí	40%	-	Neg.	<0.0001	COSM5152	Patogénica

En la tabla se muestra la variante seleccionada como posible causa en cada paciente, así como los porcentajes encontrados para cada variante en las diferentes muestras de ADN de los pacientes, y la clasificación obtenida según el Colegio Americano de Genética Médica (ACMG). Abreviaturas: Cels: Células; FFPE: Tejido embebido en parafina; GOF: Ganancia de función; Hiperp.: Hiperpigmentada; Hipop.: Hipopigmentada; HV: Hemangioma venoso; LOF: Pérdida de función; Malf.: Malformación; MV: Malformación vascular; Neg: Negativo; PHTS: Trastornos relacionados con *PTEN*; Pirosec: Pirosecuenciación; Prob: Probablemente; TMB: Tejido mucosa bucal; VUS: Variante de significado incierto; -: No hecho. El primer número de lecturas de NGS se refiere a las lecturas del alelo de referencia, mientras que el segundo número corresponde a las lecturas del alelo alternativo. En la validación mediante secuenciación Sanger, aparece un sí cuando la variante ha sido detectada también por esta técnica. *PIK3CA*: NM_006218, *AKT3*: NM_005465; *mTOR*: NM_004958; *PTEN*: NM_000314.

4.3.2 Variantes detectadas en el gen *PIK3CA*

Cuarenta y tres de los 85 (50,5%) pacientes incluidos en el estudio molecular presentaron una variante en la secuencia de ADN del gen *PIK3CA*. Los porcentajes de lecturas de NGS para el alelo alternativo variaron en función del tipo de muestra estudiada, siendo menores en el caso de ADN extraído de sangre (<20%, con la excepción de un paciente heterocigoto), aumentando en saliva (del 1% al 35%) hasta alcanzar valores más elevados en tejido afecto (del 1% al 50%). Asimismo, el porcentaje de lecturas de NGS para el alelo alternativo obtenidas en las diferentes muestras estudiadas varía en función de la patología de estudio, siendo mayores en el caso de MCAP. Aunque, la mayoría de los pacientes (12/14) en los que se identificó una variante en sangre tenían diagnóstico de MCAP, había otros dos de ellos que tenían diagnóstico de CLOVES (TSR035) o CLOVES/MCAP (TSR037), siendo los porcentajes de variante identificados muy bajos (2% y 1% respectivamente) (Figura 15).

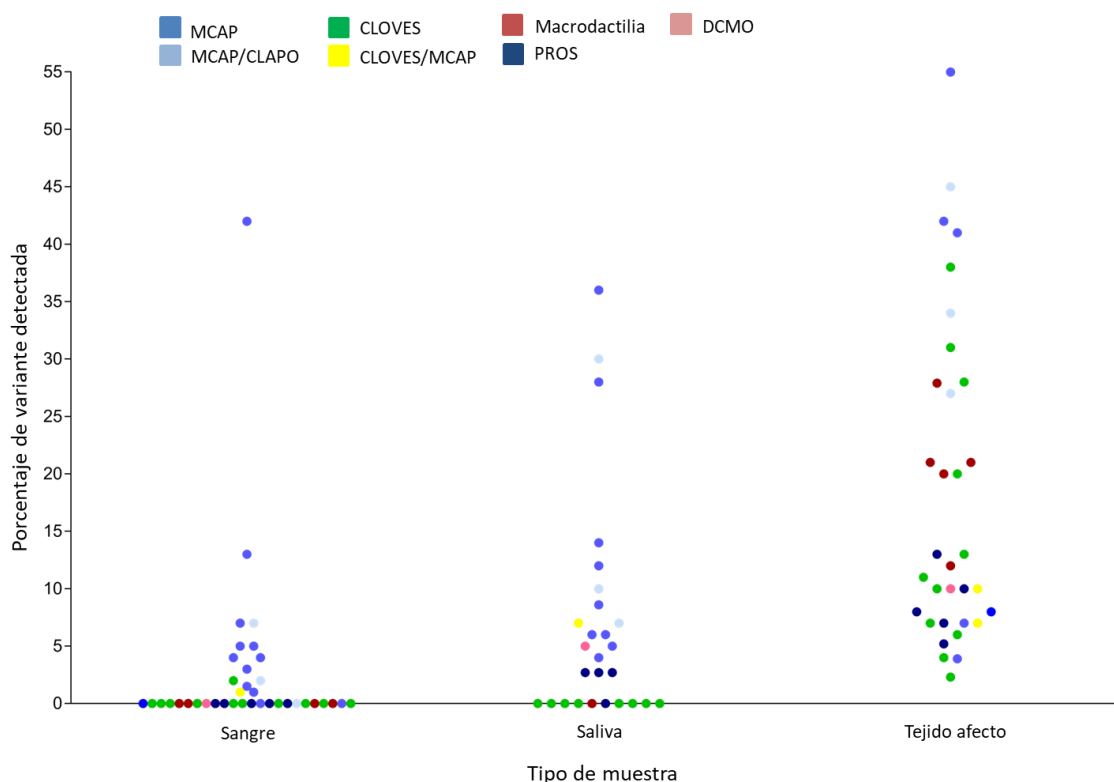


Figura 15: Porcentajes de lecturas de NGS del alelo alternativo en *PIK3CA* detectados en las muestras de sangre, saliva y/o tejido afecto de los 43 pacientes con variante detectada en este gen. El eje de ordenadas indica el porcentaje de la variante detectada, obtenido como las lecturas del alelo alternativo frente al total de las lecturas. Los puntos de diferentes colores indican el diagnóstico de cada paciente. El eje de abscisas indica el tipo de muestra en el que está presente la variante detectada.

En el estudio molecular realizado se identificaron 23 variantes diferentes en el gen *PIK3CA*, localizadas a lo largo de la proteína, la mayoría de ellas (9/23) en el dominio quinasa

(Figura 16). Las tres variantes más comunes fueron: p.His1047Arg identificada en 7 pacientes (1 MCAP, 3 CLOVES y 3 macrodactilia), p.Glu453Lys en 6 pacientes (3 CLOVES, 1 MCAP/CLAPO, 1 CLOVES/MCAP y 1 PROS) y p.Glu726Lys en cuatro pacientes con diagnóstico de MCAP. El espectro mutacional en MCAP fue el más amplio, con 11 variantes diferentes identificadas en 14 pacientes, aunque con una variante recurrente (p.Glu726Lys). En el caso del síndrome CLOVES las variantes p.Glu453Lys y p.His1047Arg se detectaron en tres pacientes cada una de ellas, y además se identificaron otras 5 variantes (Figura 16). De los cuatro pacientes con diagnóstico de macrodactilia, 3 presentaron la variante p.His1047Arg, y el cuarto p.Glu545Lys.

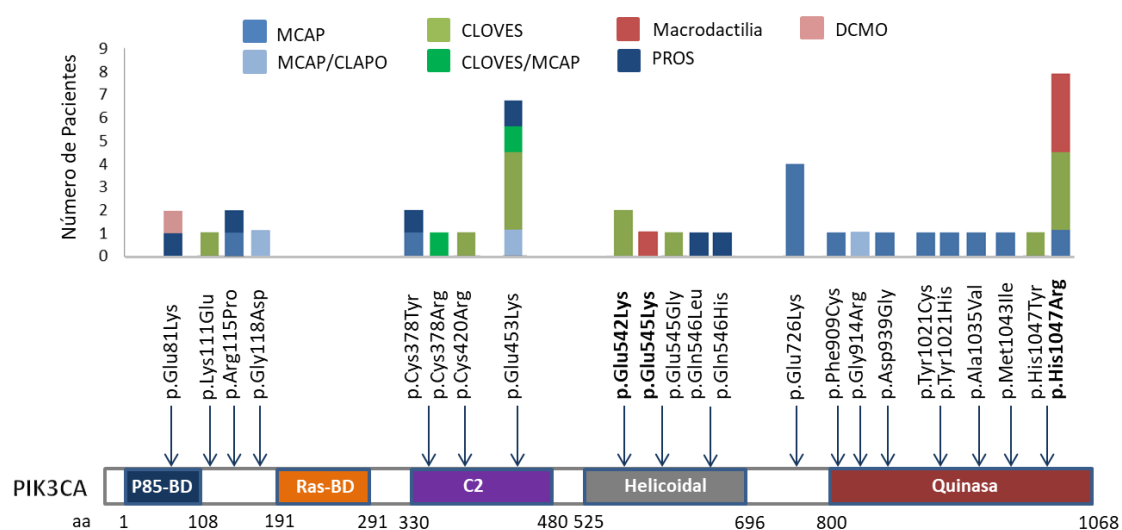


Figura 16: Distribución de las variantes identificadas a lo largo de la proteína PIK3CA. En negrita aparecen las tres variantes más frecuentes descritas en cáncer. Las columnas de diferentes colores que aparecen encima de cada variante hacen referencia al número de pacientes de cada patología que presenta dicha variante. Los dominios de la proteína, representados en el panel inferior, representan la localización de las mutaciones a lo largo de la proteína. Abreviaturas: aa: aminoácido; BD: Dominio de unión.

Cuarenta y una de las 43 variantes (95,3%) identificadas en los pacientes, fueron detectadas por primera vez mediante la técnica de NGS, mientras que las otras dos (TSR013 y TSR070) fueron identificadas por ddPCR, debido a que en el caso de TSR013 la calidad de la muestra no era suficientemente buena para llevar a cabo un experimento de NGS, y en el caso de TSR070 a que no se disponía de muestra de tejido afecto en el momento en el que se realizó la prueba de NGS, por lo que se hizo una búsqueda de los *hotspots* en *PIK3CA* mediante ddPCR. Las variantes detectadas mediante NGS, fueron validadas mediante tres técnicas diferentes: secuenciación Sanger, pirosecuenciación y /o ddPCR (Figura 17).

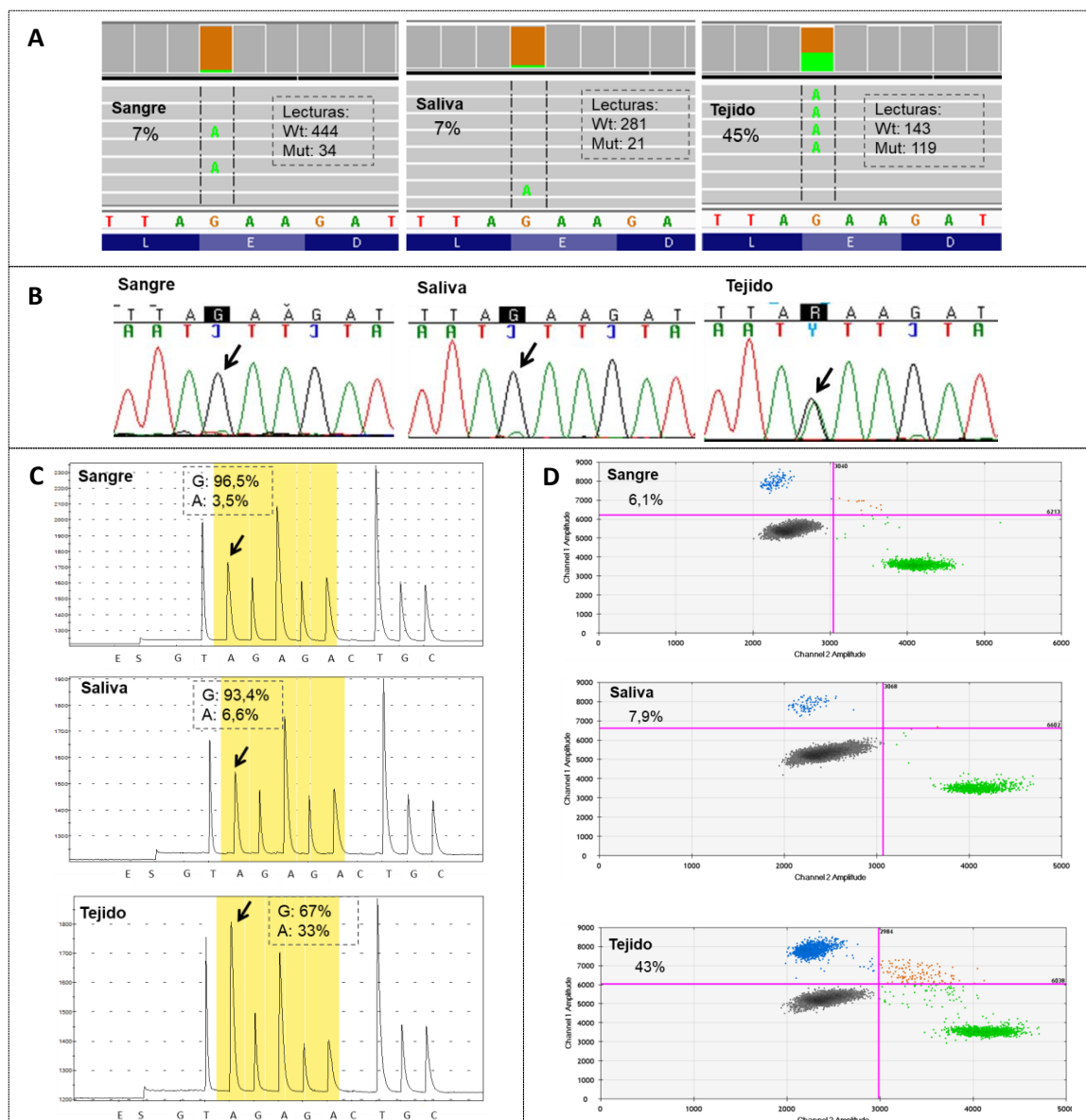


Figura 17: Resultados de NGS y validación por secuenciación Sanger, pirosecuenciación y ddPCR de la variante: *PIK3CA*:c.1357G>A: p.Glu453Lys. **A:** Resumen de resultados de NGS con el visualizador *Integrative Genome Viewer* (IGV): se observa el porcentaje de variante calculado como el número de lecturas del alelo alternativo frente al total, así como las lecturas obtenidas del alelo alternativo (Mut) y el alelo de referencia (Wt). **B:** Secuenciación Sanger mostrando la validación de los resultados de NGS en muestra de sangre, saliva y tejido afecto del paciente. La flecha indica la posición donde se ha producido el cambio de nucleótido (Guanina por Alanina), pudiendo visualizarse un pequeño pico de A en el caso de sangre y saliva, y un pico de la misma altura al nucleótido de referencia en el caso de tejido afecto. **C:** Validación mediante pirosecuenciación en las diferentes muestras del paciente. En el caso de sangre y saliva el incremento en el pico de A es muy pequeño, mientras que en tejido afecto se puede observar un gran aumento en la altura del pico. Debajo de los pirogramas aparece la secuencia de nucleótidos a analizar. **D:** Validación de la variante mediante ddPCR en las diferentes muestras. El eje de abscisas muestra la intensidad de la fluorescencia de las gotas que incluyen la sonda VIC que contienen el alelo nativo (en verde) y el eje de ordenadas indica la fluorescencia de la sonda FAM incluida en las gotas que contienen la amplificación del alelo mutado (en azul). Las gotas que no contienen ninguno de los alelos amplificados aparecen en negro, y las gotas con ambos alelos en naranja. El porcentaje se calcula dividiendo el número de gotas que contiene el alelo alternativo entre la suma de las gotas con alelo alternativo y las gotas con alelo de referencia.

Para determinar el efecto de la variante no descrita y detectada en este trabajo en *PIK3CA* (*PIK3CA*:c.2726T>G;p.Phe909Cys), así como de otras que sí estaban descritas pero no tenían estudios de funcionalidad publicados (*PIK3CA*:c.344G>C;p.Arg115Pro, *PIK3CA*:c.3062A>G;p.Tyr1021Cys, *PIK3CA*:c.3061T>C;p.Tyr1021His), se realizaron estudios *in vitro*. Asimismo, debido a los numerosos estudios publicados acerca del efecto de ganancia de función de la variante *PIK3CA*:c.3140A>G;p.His1047Arg (30, 124), se incluyó dicha variante como control positivo. Se transfectaron células COS7 con los plásmidos con las diferentes variantes. Los estudios de Western blot se realizaron utilizando anticuerpos específicos frente a las proteínas pAKT/AKT y pS6/S6 (en sus formas fosforilada y total), y se calcularon los ratios de la diferencia de señal (Figura 18). Asimismo, se realizó un análisis estadístico mediante el test de t-Student en el que se compararon los ratios pAKT/AKT y pS6/S6, de todas las variantes de *PIK3CA* estudiadas frente al plásmido nativo. Aunque se puede observar una tendencia en el aumento de actividad para las variantes estudiadas, únicamente se ven diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el plásmido con el inserto nativo de *PIK3CA* y el plásmido con el control positivo para la mutación p.His1047Arg en el caso de la señal pAKT/AKT.

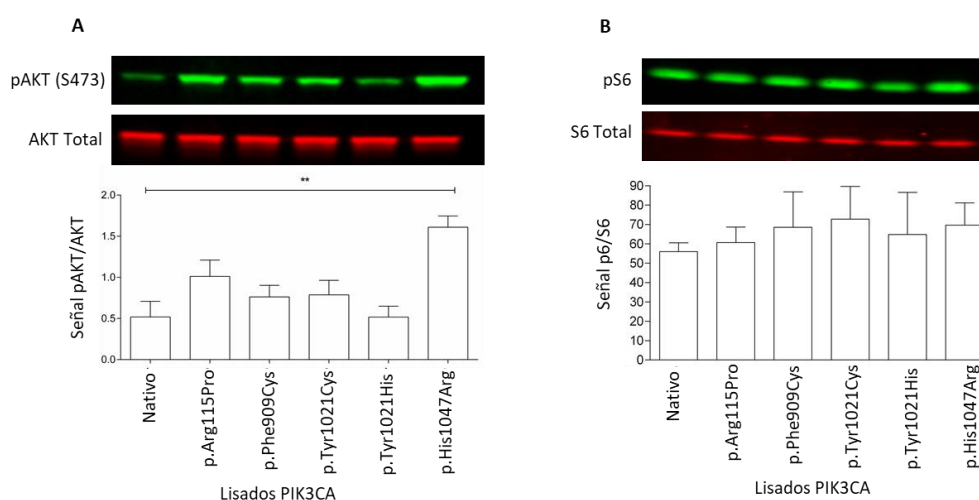


Figura 18: Resultados de la cuantificación de la señal de pAKT/AKT (A) y pS6/S6 (B) de las proteínas de las células COS7 transfectadas con los plásmidos con los diferentes insertos de *PIK3CA*. Las columnas reflejan la media de los experimentos realizados (tres en el caso de pAKT/AKT, y dos en pS6/S6) y las barras de error indican el error estándar de la media.

4.3.3 Variantes detectadas en el gen *AKT3*

Se identificó una variante (c.863C>T;p.Thr288Ile) en el dominio quinasa de *AKT3* (Figura 19) en un paciente con diagnóstico de MCAP.

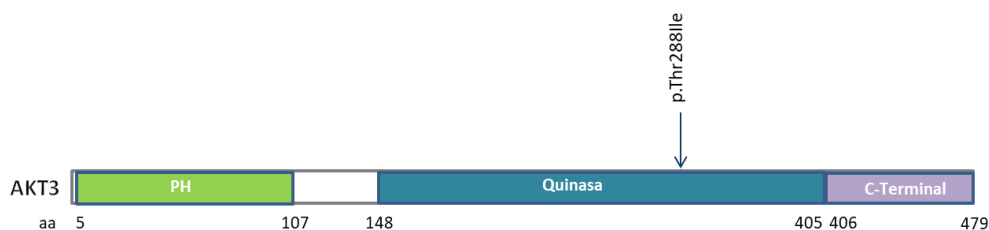


Figura 19: Localización proteica de la variante encontrada en AKT3 en el dominio quinasa. Además, se representan los dominios pleckstrin (PH) y el dominio C-terminal de la proteína. aa: aminoácido.

La variante fue detectada por la técnica de NGS en el 1% de las lecturas en sangre, 19% en saliva y 21% en tejido afecto (piel) (Figura 20A). La presencia de la variante se confirmó mediante las técnicas de secuenciación Sanger (Figura 20B) y pirosecuenciación (Figura 20C). El porcentaje detectado en sangre, no se pudo confirmar mediante estas técnicas por estar por debajo de su rango de detección, sin embargo, se confirmó mediante el panel de NGS utilizado en la colaboración con el grupo del Prof. Biesecker, en EEUU.

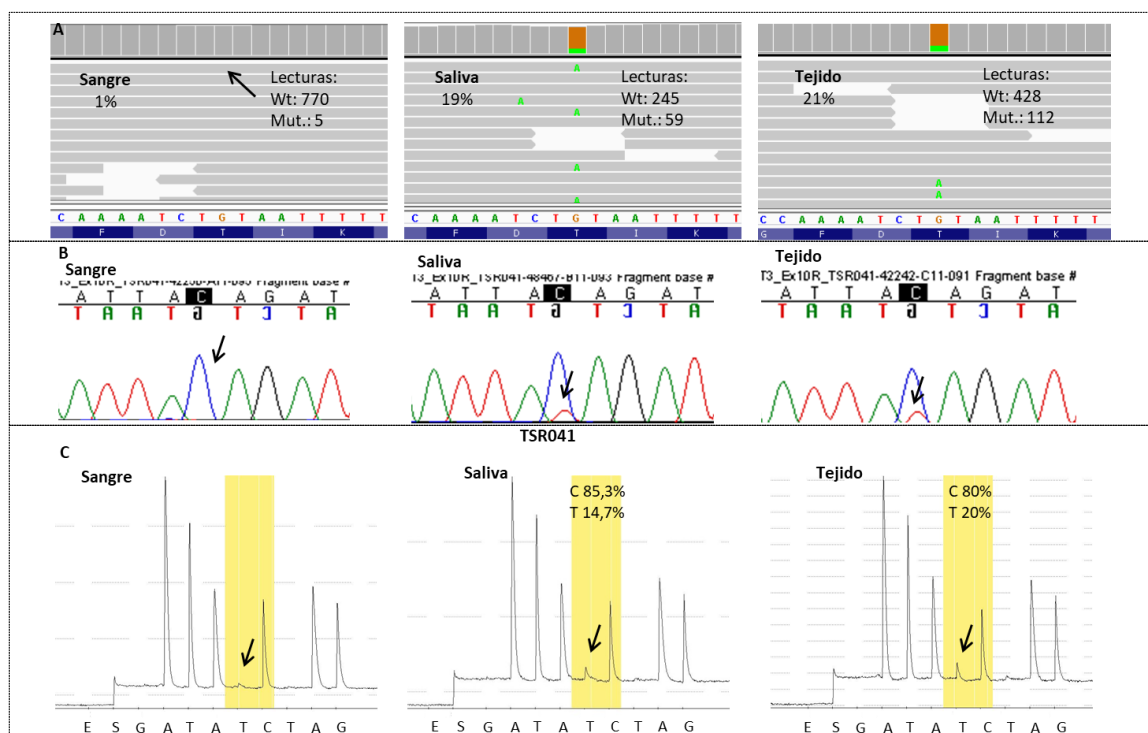


Figura 20: Resultados de NGS y validación de variantes por secuenciación Sanger y pirosecuenciación de la variante AKT3:c.863C>T;p.Thr288Ile identificada en el paciente TSR041. **A:** Resumen de resultados de NGS con el visualizador IGV: se puede observar el número de lecturas del alelo de referencia (Wt) y el alelo alternativo (Mut), así como el porcentaje de lecturas del alelo alternativo en cada tipo de muestra estudiado del paciente. **B:** Secuenciación Sanger mostrando la validación de los resultados de NGS: podemos observar el pico del nucleótido alternativo timina correspondiente al 19% y 21% en saliva y tejido afecto respectivamente, pero no el 1% en sangre, no detectable mediante esta técnica. **C:** Resultados de pirosecuenciación de la variante en los diferentes tipos de muestras del paciente: la técnica no ha sido capaz de detectar la variante en sangre, mientras que en saliva y tejido afecto aparece un pico de Timina (señalado con una flecha) correspondiente a la variante. Debajo de los pirogramas aparece la secuencia de nucleótidos a analizar.

4.3.4 Variantes detectadas en el gen *mTOR*

El estudio molecular realizado permitió la detección de variantes en otro de los genes de la ruta PI3K/AKT/mTOR. Se identificaron tres variantes diferentes en el gen *mTOR* en cuatro pacientes, por lo que fueron reclasificados como Síndrome de Smith-Kingsmore. Tres de estos pacientes (TSR015, TSR016 y TSR023) tenían un diagnóstico clínico previo de MCAP (los dos primeros eran hermanos) y el último (OGS771) de macrocefalia aislada con discapacidad intelectual. Dos de las variantes identificadas (p.Cys1483Tyr y p.Glu1799Lys) se localizaban en el dominio FAT de la proteína, mientras que la otra (p.Phe2202Cys) en el dominio quinasa (Figura 21).

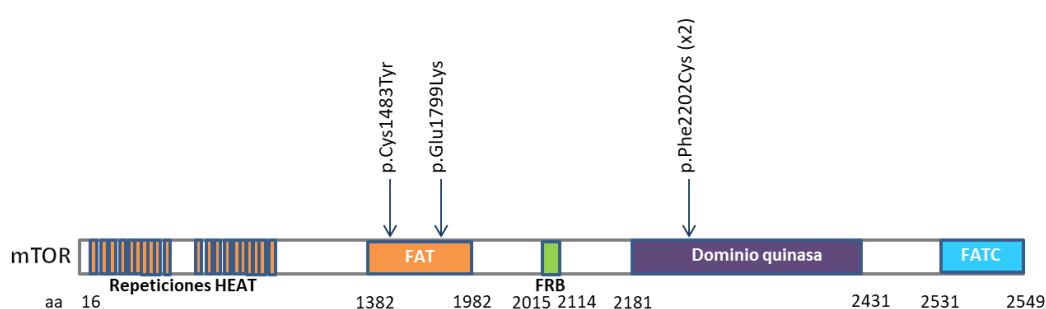


Figura 21: Localización de las variantes identificadas en mTOR a lo largo de la proteína. Se representa la estructura de la proteína de mTOR, desde el extremo N-Terminal al C-terminal. Abreviaturas: aa: aminoácido; FAT: FRAP (FKBP–proteína asociada a Rapamicina)/ATM (ataxia telangiectasia mutada)/TRRAP (dominio de proteína asociado a transformación/transcripción). FATC: FATC-terminal; HEAT: *Huntington, Elongation factor 3, protein phosphatase 2A, and the yeast kinase TOR1*.

La variante p.Glu1799Lys fue identificada en el paciente OGS771 en heterocigosis, al igual que la variante p.Phe2202Cys identificada en los pacientes TSR015 y TSR016. Estos dos pacientes eran hermanos, y la variante detectada en ellos no estaba presente en muestra de ADN extraído de linfocitos de sangre periférica de los padres ni en muestra de semen del padre, por lo que se sugiere que la madre es portadora de una mutación en mosaico germinal. Las variantes fueron detectadas mediante NGS en los tres casos, y confirmadas mediante secuenciación Sanger (Figura 22). El paciente TSR023 presentó la variante p.Cys1483Tyr en diferentes porcentajes de lecturas de NGS en sus diferentes muestras estudiadas, siendo 2% en sangre, 11% en saliva y 28% en piel hipopigmentada. La validación de las variantes en este paciente, mediante la técnica de pirosecuenciación, determinó la presencia de la misma variante en el 16,6% de piel hiperpigmentada, así como confirmó la presencia de la variante en las otras muestras del paciente (Figura 22C), y la ausencia en muestra de los padres.

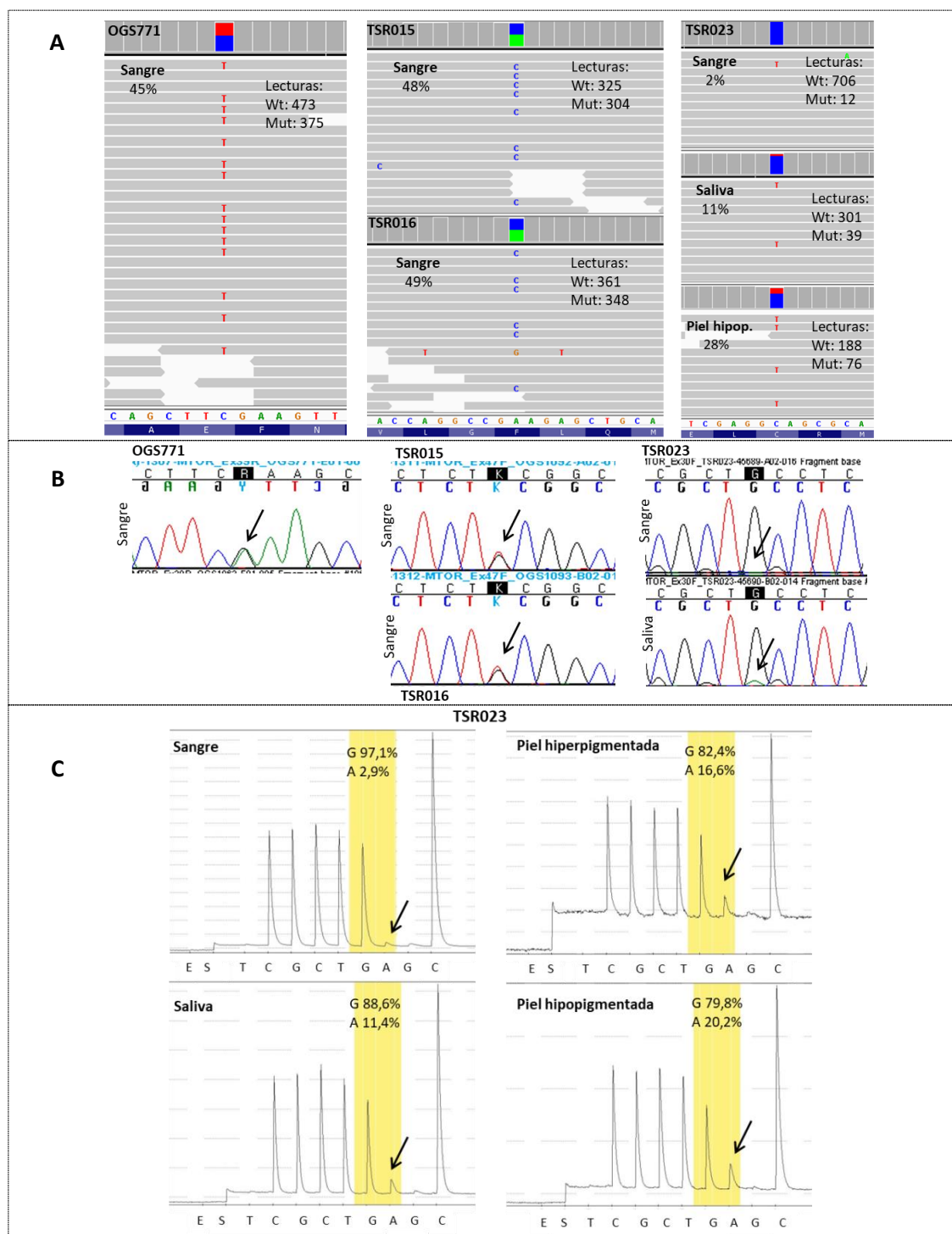


Figura 22: Resultados de NGS y validación de las variantes en *mTOR* por secuenciación Sanger o pirosecuenciación. **A:** Resumen de resultados de NGS con el visualizador *Integrative Genome Viewer* (IGV): se puede observar el número de lecturas del alelo de referencia (Wt) y el alelo alternativo (Mut), así como el porcentaje de lecturas del alelo alternativo en las muestras de cada paciente: OGS771, TSR015 y TSR016 en heterocigosis, y TSR023 en diferentes porcentajes según el tejido estudiado. **B:** Secuenciación Sanger mostrando la validación de los resultados de NGS en muestra de sangre de los cuatro pacientes, además de saliva de TSR023. **C:** Resultados de pirosecuenciación de la variante en los diferentes tipos de muestras del paciente TSR023: puede observarse cómo la altura del pico (señalado con una flecha) aumenta cuando se estudia muestra de tejido afecto en comparación con saliva y más aún con sangre. Debajo de los pirogramas aparece la secuencia de nucleótidos a analizar.

4.4 Revisión del fenotipo

4.4.1 Espectro de Sobrecrecimientos asociados a *PIK3CA*

Se obtuvo información clínica completa de 66 de los 96 pacientes de la cohorte total, incluyendo 24 pacientes con diagnóstico de MCAP, 3 con MCAP/CLAPO, 22 con CLOVES, 2 con CLOVES/MCAP, 7 con macrodactilia y 8 con PROS en general. La información clínica se recogió de las historias clínicas de los pacientes en cuestionarios elaborados específicamente para ello (Anexo II), los cuales incluían tablas de características frecuentes en los síndromes MCAP y CLOVES, los más frecuentes en nuestra cohorte. Las características clínicas se acompañaron del código HPO (*Human Phenotype Ontology* - <http://purl.obolibrary.org/obo/hp/releases/2017-12-12/hp.owl>) correspondiente, y se agruparon en: cabeza y cuello, piel, crecimiento, sistema cardiovascular, sistema esquelético, sistema nervioso, musculatura, neoplasias, tejido conectivo y subcutáneo, sistema genitourinario y abdomen.

Las características más frecuentes en pacientes con MCAP fueron: macrocefalia presente en un 75% (18/24) de los pacientes, malformación capilar reticulada en un 50% (12/24), asimetría facial, retardo global del desarrollo e hipotonía muscular en un 45,8% (11/24), y sindactilia de los dedos de pies y manos grandes en un 41,6% (10/24) de los pacientes. La malformación capilar de la línea media estaba presente en el 37,5% (9/24) de los casos (Tabla 14).

Los pacientes con CLOVES presentaron con más frecuencia: macrodactilia en un 68,2% (15/22), seguido de hemihipertrofia y malformaciones capilares con un 54,4% (12/22). Asimismo, la mitad de los pacientes (50%, 11/22) desarrollaron lipomas.

Tres de los siete pacientes con macrodactilia aislada presentaron sindactilia, y tres presentaron algún tipo de anomalía de la piel (un paciente manchas café con leche y dos nevi).

En el caso de los pacientes con diagnóstico de PROS no específico, las características más comunes fueron hemihipertrofia en 4 de 8 pacientes (50%), malformación capilar y nevus en 3 de 8 (37,5%) pacientes. La macrocefalia estuvo presente en 2 pacientes (25%), así como la asimetría facial, la malformación capilar reticulada o los lipomas. Los datos clínicos de los pacientes con diagnóstico de PROS no específico no permiten clasificarlos dentro de ninguno de los subgrupos dentro del espectro.

Tabla 14: Características clínicas observadas en 67 pacientes de la cohorte PROS.

HPO	Característica clínica	Frecuente	MCAP	MCAP/ CLAPO	CLOV ES	CLOVES/ MCAP	Macroda ctilia	PROS
Cabeza y cuello								
HP:0000256	Macrocefalia	MCAP	18	2	1	2	-	2
HP:0004481	Macrocefalia progresiva	MCAP	7	-	-	-	-	-
HP:0000324	Asimetría facial	MCAP, CLOVES	11	2	5	2	-	2
HP:0001999	Dismorfismo facial	MCAP	7	2	-	-	-	-
HP:0000316	Hipertelorismo	MCAP	5	2	-	1	-	-
HP:0000648	Atrofia óptica	MCAP	-	-	-	-	-	-
HP:0000286	Epicanto	MCAP	3	-	-	-	-	-
HP:0000568	Microftalmia	MCAP	-	-	-	-	-	-
HP:0000490	Ojos hundidos	MCAP	-	-	-	-	-	-
HP:0009748	Lóbulo de la oreja grande	MCAP	1	2	-	-	-	-
HP:0000337	Frente amplia	MCAP	6	1	1	-	-	-
HP:0000348	Frente alta	MCAP	-	1	-	-	-	-
HP:0002007	Frente prominente	MCAP	7	3	-	1	-	-
HP:0000293	Mejillas rellenas, prominentes	MCAP	-	1	-	-	-	-
HP:0000494	Hendiduras palpebrales de oblicuidad descendente	MCAP	3	-	-	1	1	-
HP:0005280	Puente nasal deprimido	MCAP	2	1	-	1	-	-
HP:0000319	Filtrum liso	MCAP	-	-	-	-	-	-
HP:0000154	Boca ancha	MCAP	-	-	-	-	-	-
HP:0000159	Anomalía del labio	MCAP	4	-	1	-	-	-
HP:0000470	Cuello corto	MCAP	2	1	-	-	-	-
HP:0007601	Malformación capilar (Hemangioma) de la línea media de la cara: labio / filtrum / glabella.	MCAP	9	3	1	-	-	1
HP:0007466	Malformación capilar (Hemangioma) del medio de la frente	MCAP	1	-	1	-	-	-
HP:0007452	Malformación capilar (Hemangioma) del tercio medio de la cara	MCAP	-	-	-	-	-	-
HP:0000996	Malformación capilar (Hemangioma) facial (otros)	MCAP	5	1	1	-	-	2
HP:00044372	Hiperostosis craneal	CLOVES	-	1	-	-	-	-
Piel								
HP:0000965	Cutis marmorata (Malf. Capilar reticulada/marmorea)	MCAP	12	2	3	-	-	2
HP:0100585	Telangiectasia de la piel	MCAP	4	-	-	1	-	-
HP:0007509	Manchas de hipo e hiperpigmentación	MCAP	1	-	3	1	-	2
HP:0000957	Manchas café con leche	MCAP	-	-	-	1	1	2
HP:0001053	Manchas hipopigmentadas de la piel	MCAP	2	-	1	-	-	-
HP:0003764	Nevus	CLOVES	6	2	7	1	2	3

Crecimiento								
HP:0001548	Crecimiento excesivo (Sobrecrecimiento generalizado)	MCAP/CLOVES	7	-	3	1	-	-
HP:0100555	Crecimiento asimétrico (Sobrecrecimiento parcial)	MCAP	9	1	4	-	-	2
HP:0001528	Hemihipertrofia	CLOVES	8	1	12	2	-	4
HP:0100559	Asimetría de extremidad inferior	CLOVES	4	-	4	2	-	1
HP:0001520	Macrosomía	MCAP	8	1	-	1	-	-
Sistema cardiovascular								
HP:0005306	Malformación capilar (Hemangioma capilar)	MCAP	9	2	12	2	-	3
HP:0100026	Malformación arteriovenosa	MCAP	-	-	-	1	-	-
HP:0002597	Anomalías vasculares	CLOVES	2	-	5	2	-	1
HP:0012721	Malformación venosas	CLOVES	2	1	3	-	-	-
HP:0100766	Anomalía vasos linfáticos (Linfedema)	CLOVES	3	2	4	1	-	1
HP:0011675	Arritmia	MCAP	1	-	-	-	-	-
HP:0001629	Defecto septal ventricular	MCAP	1	-	-	-	-	-
HP:0100761	Angiomatosis visceral	MCAP	-	-	-	-	-	-
Sistema esquelético								
HP:0010442	Polidactilia	MCAP	1	-	-	-	-	-
HP:0001161	Polidactilia de la mano	MCAP	1	-	-	-	-	-
HP:0001829	Polidactilia de pie	MCAP	3	-	1	1	-	-
HP:0001159	Sindactilia	MCAP		1	1	-	-	-
HP:0006101	Sindactilia de dedo	MCAP	2	1	3	-	1	-
HP:0001770	Sindactilia de dedo del pie	MCAP	10	-	3	2	2	-
HP:0004099	Macroductilia	CLOVES	1	-	15	1	7	1
HP:0001852	Sandal gap	CLOVES	4	1	2	1	-	1
HP:0001388	Laxitud articular	MCAP	5	-	-	-	-	-
HP:0001382	Hiperlaxitud articular	MCAP	5	1	-	1	-	-
HP:0002650	Escoliosis	CLOVES	1	-	2	-	-	-
HP:0001176	Manos grandes	CLOVES	10	-	4	-	-	-
HP:0001169	Manos anchas	CLOVES	6	-	-	-	-	-
HP:0001769	Pies anchos	MCAP/CLOVES	7	-	2	-	-	-
Sistema nervioso								
HP:0001355	Megalencefalia	MCAP	4	-	-	-	-	-
HP:0007206	Hemimegalencefalia	MCAP	4	1	-	1	-	-
HP:0002389	Cavum septum pelúcido	MCAP	6	1	-	-	-	-
HP:0002308	Malformación de Arnold-Chiari	MCAP	4	2	-	-	-	-
HP:0002269	Anormalidad de la migración neuronal	MCAP	2	-	-	-	-	-
HP:0001250	Epilepsia / Convulsiones	MCAP	7	2	1	-	-	-
HP:0002637	Isquemia cerebral	MCAP	-	-	-	-	-	-
HP:0002119	Ventriculomegalia	MCAP	8	2	-	1	-	-
HP:0100543	Deterioro cognitivo	MCAP	-	-	-	-	-	-

HP:0007360	Aplasia / hipoplasia del cerebelo	MCAP	-	1	-	-	-	-
HP:0001263	Retardo global del desarrollo	MCAP	11	3	1	1	-	-
HP:0002126	Polimicrogiria	MCAP	7	1	-	1	-	1
HP:0002858	Meningioma	MCAP	-	-	-	-	-	-
HP:0000238	Hidrocefalia	MCAP	9	1	-	-	-	-
HP:0001249	Discapacidad intelectual	MCAP	2	1	1	-	-	-
HP:0010301	Mielodisrafia (Espina bífida)	CLOVES	-	-	-	-	-	-
HP:0002144	Médula anclada	CLOVES	-	-	-	-	-	-
HP:0002500	Anomalías de la materia blanca	MCAP	4	1	-	-	-	1
HP:0007099	Herniación de amígdalas cerebelosas	MCAP	6	2	-	1	-	-
HP:0002539	Displasia cortical	MCAP	1	1	-	-	-	1
Asimetría cerebral	Asimetría cerebral	MCAP	3	-	-	-	-	-
Asimetría del cerebelo	Asimetría del cerebelo	MCAP	-	-	-	-	-	-
Musculatura								
HP:0001252	Hipotonía muscular	MCAP	11	3	-	2	-	-
Neoplasias								
HP:0002667	Nefroblastoma (Tumor de Wilms)	MCAP	-	-	-	-	-	-
HP:0012032	Lipoma	CLOVES	1	-	11	-	-	2
HP:0001909	Leucemia	MCAP	-	-	-	-	-	-
Tejido conectivo y subcutáneo								
HP:0003549	Anomalías del tejido conectivo	MCAP	2	-	-	-	-	-
HP:0100790	Hernia	MCAP	2	-	-	1	-	-
Sistema genitourinario								
HP:0008678	Hipoplasia / Aplasia renal	CLOVES	1	-	-	-	-	-
Abdomen								
HP:0001744	Esplenomegalia	CLOVES	-	-	1	-	-	-
HP:0001537	Hernia umbilical	MCAP	1	1	-	-	-	-

La primera y segunda columnas indican el código y término HPO respectivamente. A continuación se indica la patología dentro del espectro PROS (MCAP o CLOVES) donde ha sido más frecuentemente identificada cada característica clínica en la literatura, seguido del número de pacientes de cada patología (MCAP, MCAP/CLAPO, CLOVES, CLOVES/MCAP, Macroductilia, y PROS inespecífico) en nuestra cohorte en los que se ha observado cada característica.

Solapamiento fenotípico

La revisión clínica llevada a cabo permitió identificar cinco pacientes incluidos en la cohorte PROS con solapamiento fenotípico entre varias patologías causadas por mutaciones post-cigóticas en *PIK3CA*. En primer lugar, se identificaron tres pacientes (TSR026, TSR029 y TSR030) (Figura 23) con un diagnóstico clínico inicial de MCAP, por presentar macrocefalia (2/3), frente prominente (3/3), malformación capilar de la línea media en frente y filtrum (3/3),

retardo global del desarrollo (3/3) e hipotonía (3/3), entre otras características comunes en MCAP; y que sin embargo también presentaban malformación capilar en labio inferior y malformación linfática en cuello (3/3), las dos características clínicas principales del Síndrome CLAPO, motivo por el que fueron reclasificados como MCAP/CLAPO.



Figura 23: Características clínicas de tres pacientes con solapamiento fenotípico MCAP/CLAPO. Paciente TSR030 (A): macrocefalia, frente prominente, malformación capilar reticulada generalizada y malformación capilar en glabella, filtrum y labio inferior. Paciente TSR029 (B): frente prominente, hipertelorismo, malformación capilar de la línea media (frente, glabella y labio inferior), y malformaciones capilares generalizadas por todo el cuerpo, sobrecrecimiento asimétrico del lado izquierdo del cuerpo y malformación linfática en el cuello. Paciente TSR026 (C): macrocefalia, asimetría facial, hipertelorismo, macroglosia, frente prominente y malformación capilar de la línea media facial (glabella, nariz y labio inferior).

Por otro lado, se identificaron dos pacientes (TSR037 y TSR053) con solapamiento fenotípico entre los síndromes CLOVES y MCAP. El primero de estos pacientes (TSR037), del que no se disponía de fotografías, mostraba características frecuentemente presentes en pacientes con MCAP (Figura 6) como son macrocefalia, junto con hemimegalencefalia derecha (sin crisis) y retraso leve del desarrollo psicomotor. Además, presentaba asimetría facial derecha, sobrecrecimiento con hemihipertrofia derecha del cuerpo, polidactilia postaxial en pie derecho y sindactilia bilateral de los dedos 2 y 3 del pie, así como hipotonía muscular y hernia inguinal; todas ellas, características también asociadas a MCAP. Sin embargo, presentaba también características clínicas compatibles con el síndrome CLOVES (Figura 7) como son 1) el tipo específico de compromiso de las malformaciones vasculares: lesiones de hiperpigmentación cutánea siguiendo las líneas de Blaschko, más evidentes en la extremidad inferior derecha, manchas café con leche, lesiones angiomasos telangiectásicas confluyentes

y extensas distribuidas por tronco, una mancha en vino oporto en la nuca, malformación capilar plana y extensa distribuida por tórax, abdomen y extremidades, así como malformaciones capilares en hemicuerpo derecho, 2) hipertrofia de miembro inferior derecho con mayor volumen de los diferentes grupos musculares, y 3) particularmente, aumento homogéneo del tejido celular subcutáneo, así como un aumento de la separación de los dedos primero y segundo del pie (*sandal gap*).

El paciente TSR053 (Figura 24), presentaba características típicas de MCAP como son macrocefalia, frente prominente, malformación capilar extensa, sindactilia cutánea bilateral de los dedos 2 y del pie izquierdo y de los dedos 2, 3 y 4 del pie derecho, hiperlaxitud articular, hipotonía muscular marcada y anomalías del sistema nervioso central (ventriculomegalia, polimicrogiria bilateral extensa y herniación de las amígdalas cerebelosas). Este paciente además presentaba hemihipertrofia derecha con aumento de miembro inferior izquierdo, anomalías vasculares (aorta abdominal estrecha) y macrodactilia del segundo dedo de la mano derecha y del primer y segundo dedo de la mano izquierda, características típicas de CLOVES.

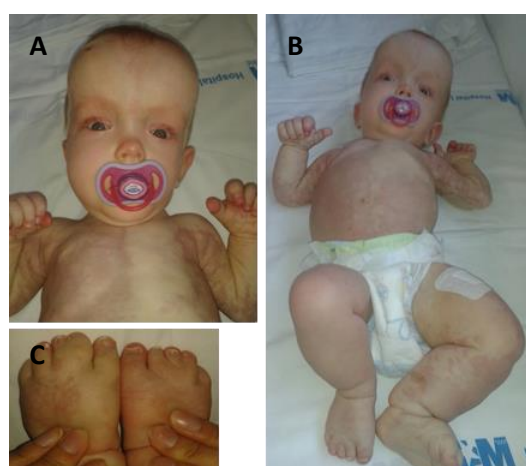


Figura 24: Características clínicas del paciente TSR053 con fenotipo solapante CLOVES/MCAP. Se pueden apreciar las características típicas de MCAP (A) la macrocefalia, frente prominente, puente nasal ancho y deprimido, (A y B) malformación capilar extensa, y (C) sindactilia cutánea bilateral de los dedos 2 y del pie izquierdo y de los dedos 2, 3 y 4 del pie derecho. Asimismo, podemos observar hemihipertrofia derecha con aumento lipomatoso de miembro inferior izquierdo (B) típica de CLOVES.

4.4.2 Paciente con variante en *AKT3* – Macrocefalia-Malformación Capilar

Los estudios de NGS realizados en este trabajo permitieron determinar la presencia de una variante en el gen *AKT3* en un paciente con diagnóstico clínico de MCAP. Se trataba de un niño de 8 años de edad, del cual disponíamos de muestras de ADN de linfocitos de sangre

periférica, saliva, y tejido afecto (biopsia de piel), así como muestra de ADN de linfocitos de sangre periférica de los padres.

Entre las características clínicas que se reportaron al remitir el paciente podemos destacar la macrocefalia y frente prominente, malformación capilar en filtrum y en rodilla derecha, sindactilia de los dedos 2 y 3 en los pies, hipotonía leve, y una dismetría del miembro inferior izquierdo con acortamiento de este (Figura 25). Ya al nacimiento se le detectó macrocefalia, hipertelorismo, fisuras palpebrales de inclinación descendente, orejas de implantación baja, hipotonía axial leve y la malformación capilar en filtrum y en rodilla derecha. Presentaba además dilatación ventricular. A los dos meses de vida requirió una válvula de derivación ventrículo-peritoneal (VDVP), y a los 5 meses manifestó estatus convulsivo posiblemente debido a fallo de VDVP, diagnosticándolo en ese momento de encefalopatía malformativa. Los estudios de neuroimagen realizados (Figura 25 C y D) mostraron alteración de surcos corticales en hemisferio izquierdo, polimicrogiria, cavum septum pellucidum y cavum vergae, ventriculomegalia supratentorial, descenso mínimo de amígdalas cerebelosas, e hidrocefalia.

Todas estas características son altamente compatibles con un diagnóstico de MCAP. Las mutaciones constitutivas en *AKT3* se asocian con megalocefalia, con o sin autismo, similar a los trastornos relacionados con *PTEN*, pero no con el resto de manifestaciones no cerebrales asociadas a MCAP (137).

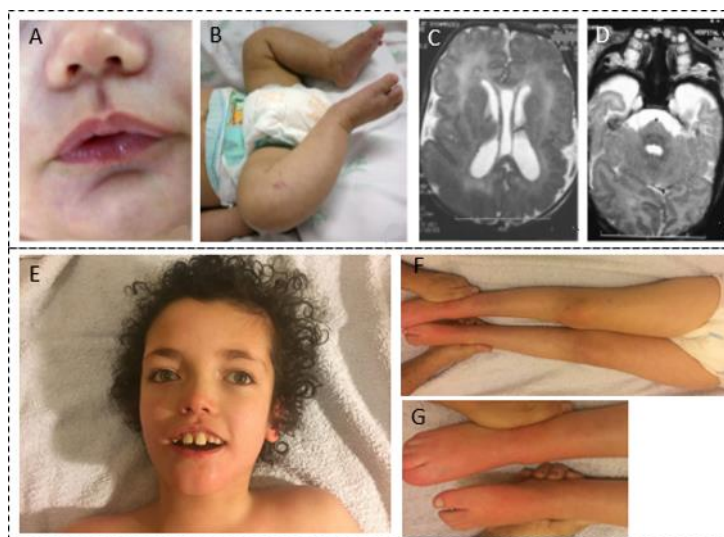


Figura 25: Características clínicas principales del paciente TSR041 con diagnóstico de MCAP y variante en *AKT3*. El panel superior corresponde al paciente cuando tenía 6 meses de edad: se puede observar la malformación capilar en el labio superior (A) y rodilla derecha así como signos de cutis marmorata (B); hemimegalencefalia, asimetría ventricular, cavum septum pellucidum y cavum vergae (C y D). El panel inferior corresponde al paciente en la actualidad, y podemos observar hipertelorismo y fisuras palpebrales de inclinación descendente (E), dismetría del miembro inferior izquierdo con acortamiento de este (F) y sindactilia (F y G). Las fotografías A, B, C y D están modificadas de (138).

4.4.3 Pacientes con variantes en *mTOR*- Síndrome de Smith-Kingsmore

Cuatro de los pacientes incluidos en el estudio fueron diagnosticados finalmente como Síndrome de Smith-Kingsmore, tras ser identificadas en su ADN variantes patogénicas o probablemente patogénicas en el gen *mTOR*, y proceder además, a la revisión de sus características clínicas. Tres de estos pacientes (P2-TSR023, P3-TSR015 y P4-TSR016 en la figura 26) tenían un diagnóstico clínico previo de MCAP, mientras que el otro paciente (P1-OGS771) fue incluido en el estudio por presentar macrocefalia aislada y discapacidad intelectual. Las principales características que comparten los 4 pacientes fueron discapacidad intelectual y macrocefalia/megalencefalia. Los pacientes no presentaban otras características típicas de MCAP como son el sobrecrecimiento/asimetría, la sindactilia, la polidactilia o la malformación capilar en la línea media facial.

La revisión clínica de estos pacientes, fue acompañada de una búsqueda bibliográfica, la cual determinó la existencia de otros 23 pacientes con características clínicas similares a las de los pacientes aquí descritos (Tabla 15) y mutaciones en el gen *mTOR*. Este estudio dio lugar a la publicación de un artículo científico que describe las características clínicas y moleculares del Síndrome de Smith-Kingsmore (Artículo científico incluido en Anexo III).



Figura 26: Características faciales de los pacientes con SKS. Los pacientes 1, 2, 3 y 4 muestran una combinación de los dos fenotipos diferentes asociados a SKS: macrocefalia (P1, P2, P4), hipertelorismo (P2, P3, P4), filtrum largo (P3, P4), y cara triangular con barbilla puntiaguda (P1, P3, P4). Además presentan características clínicas menos comunes en SKS: malformación capilar facial (más apreciable en P3), ojos hundidos (P1), estrabismo (P3), filtrum liso (P2, P3, P4) y orejas rotadas posteriormente (P4). P1=OGS771; P2=TSR023; P3=TSR015; P4=TSR016.

Tabla 15: Características clínicas de los cuatro pacientes diagnosticados como Síndrome de Smith-Kingsmore en nuestro estudio.

	OGS771	TSR023	TSR015	TSR016
Edad (años)	16	8	9	10.5
Género	H	H	M	H
Peso/Altura postnatal	Alto	N	N	N
Megalencefalia/ Macrocefalia	+	+	Progresiva	Progresiva
OFC	>+4 SD	+4SD	>+3SD	>+6.5SD
Grande para edad gestacional	+	+	+	+
Autismo	+		-	-
Hiperactividad	+		-	-
Discapacidad intelectual	Media- moderada	+	Severa	Severa
Lenguaje	Retraso		Retraso	Retraso
Epilepsia	-	+	-	-
Diastasis recti o hernia umbilical	-	-	-	-
Cara	Ojos hundidos. Barbilla pequeña y triangular.	Hipertelorismo, apariciencia de boca abierta y filtrum liso.	Malformación capilar, filtrum liso.	Filtrum liso, orejas rotadas
Piel	-	Hiperpigmenta- ción siguiendo las líneas de Blaschko en brazos y piernas.	Malformación capilar en hombros, y áreas de hipopigmenta- ción e hiperpigmenta- ción.	Malformación capilar reticulada, malformación capilar peri- axilar.
Otros	Manos grandes, camptodacti- lia.	Estrabismo. Hipotonía, neonatal, hipoglicemia. Hipospadias.	Estrabismo. Edad ósea retrasada, hipotonía.	Pies equinovaros, hipotonía, reducción de grasa subcutánea, Edad ósea retrasada.
Imagen CNS	Megalencefa- lia	Ventriculomega- lia, gliosis, cavum vergae, malformación venosa periventricular.	N	Ventriculomega- lia, hidrocefalia.

Abreviaturas: H: Hombre; M: Mujer; N: Normal; +: Presente; -: No presente.

5. DISCUSIÓN

En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la evaluación tanto clínica como molecular de una cohorte española de 96 pacientes con características clínicas compatibles con el Espectro de Sobrecrecimientos Asociados al gen *PIK3CA*, también conocido como espectro PROS. Bajo este nombre se incluye un grupo de síndromes clínicamente no bien definidos, muchos de ellos de descripción reciente, y de difícil diagnóstico molecular, ya que el denominador común es que están causados por mutaciones de ganancia de función (GOF) del gen *PIK3CA* en forma de mosaicismo somático. Esto último explica a su vez tanto la gran variabilidad fenotípica como el frecuente solapamiento de manifestaciones clínicas entre las diferentes entidades dentro del espectro PROS. Con este trabajo se propuso expandir y delinear mejor el espectro fenotípico y genotípico de los principales síndromes y/o alteraciones aisladas incluidas en PROS (MCAP, CLOVES y macrodactilia), así como un grupo de pacientes con características compatibles con PROS, pero clínicamente difícil de subclasificar dentro del espectro. También se llevaron a cabo los estudios necesarios para implementar la tecnología y el protocolo más adecuado para el diagnóstico de estos pacientes (Anexo I - Figura Anexa).

5.1 Estudio de la cohorte de pacientes

De la cohorte estudiada, una de las más grandes a nivel internacional, junto con las publicadas recientemente en EEUU (89) y Francia (65), en todos los casos el diagnóstico inicial con el que se remitió al paciente estuvo basado únicamente en características clínicas y fue determinado por especialistas en genética clínica y en cirugía vascular con amplia y reconocida experiencia en estas patologías, incluido nuestro propio grupo. En el 11,4% (11/96) de los pacientes, el diagnóstico final fue diferente al diagnóstico inicial con el que fueron incluidos en el estudio. Una cifra que asciende a 15,9% (11/69) si no se cuentan los ocho pacientes con macrodactilia aislada, por no considerarse una entidad difícil de diagnosticar, ni tampoco los 19 pacientes con diagnóstico genérico de PROS, por no tener un diagnóstico específico de inicio. De estos 11 pacientes, seis cambiaron a otro diagnóstico incluido dentro del propio espectro PROS, y los cinco restantes cambiaron a un diagnóstico externo a PROS y causado por un gen diferente a *PIK3CA*, aunque en todos los casos pertenecientes a una misma ruta molecular, PI3K/AKT/mTOR: cuatro pacientes presentaban el síndrome de Smith-Kingsmore causado por mutaciones en el gen *mTOR*, y un paciente con macrocefalia asociada a *PTEN*. Por otro lado, como se comentará más adelante, solo un paciente mantuvo su diagnóstico clínico inicial (MCAP) a pesar de haberse detectado una variante en otro gen diferente a *PIK3CA*, pero dentro de la misma ruta molecular, el gen *AKT3*.

El cambio en el diagnóstico de un paciente con una enfermedad rara no es un hecho excepcional, tal vez explicable por su gran número, diversidad y solapamiento fenotípico, o por la aparición de nuevos síndromes que se ajusten más a las características personales del paciente. Para determinar qué pudo justificar estos cambios en la cohorte estudiada, se analizó en primer lugar el grupo más amplio, los pacientes con MCAP. Tres de los 37 pacientes inicialmente incluidos en este grupo fueron reclasificados como fenotipo solapante MCAP/CLAPO y otros tres como síndrome de Smith-Kingsmore. Este último síndrome se encuentra fuera del espectro PROS aunque comparte algunas características clínicas con este, y se discutirá más adelante.

El síndrome CLAPO, descrito clínicamente por nuestro grupo en 2008 (92), es una enfermedad poco frecuente también asociada a malformaciones vasculares y sobrecrecimiento. Actualmente, se sabe que esta patología también está causada por mutaciones somáticas y de ganancia de función del gen *PIK3CA*, gracias a un trabajo realizado por nuestro grupo y publicado en febrero de este mismo año (93) (Artículo científico incluido en Anexo III).

Los tres pacientes con solapamiento fenotípico MCAP/CLAPO tenían múltiples características clínicas y radiológicas asociadas a MCAP (Tabla 14, Figura 23), así como variantes en mosaico confirmadas en el gen *PIK3CA*, todas diferentes (c.353G>A;p.Gly118Asp, c.1357G>A;p.Gly453Lys y c.2740G>A;p.Gly914Arg) y descritas previamente en pacientes con MCAP y CLOVES (65, 89). Por otro lado, los tres pacientes mostraban el considerado como sello distintivo de CLAPO: la combinación de malformación capilar del labio inferior y malformación linfática de la cara y el cuello, estableciendo así una superposición fenotípica entre estas dos entidades y sugiriendo causas moleculares estrechamente relacionadas, lo que como ya se ha comentado, pudo ser finalmente demostrado. Anatómicamente, la afectación diferencial del labio inferior (característica principal en CLAPO) o el labio superior (típica en MCAP) es distintiva y relevante ya que tienen orígenes embriológicos e implicaciones clínicas distintas, poniendo además en evidencia cómo se originan los patrones de afectación tisular en los mosaicismos somáticos a través de la afectación de diferentes estructuras embriológicas.

Uno de los pacientes MCAP/CLAPO (TSR030) además presentaba hipoglicemia no dependiente de insulina, parecida a la causada por las variantes de ganancia de función en *AKT2* (23, 139), un gen estudiado en el paciente y en el que no se detectaron variantes. Este paciente junto con otros dos pacientes de Reino Unido, forman parte de un estudio publicado

junto con el Dr. Robert K. Semple demostrando que las mutaciones somáticas en *PIK3CA* causan además hipoglicemia no cetótica severa, probablemente causada por la extensión del mosaicismo en el hígado (122) (Artículo científico incluido en Anexo III). Asimismo, el estudio publicado recientemente por McDermott y col. (140) coincide con estos hallazgos, añadiendo además, que existe variabilidad tanto en la naturaleza como en la severidad de la hipoglicemia según los datos obtenidos en su cohorte de pacientes.

El solapamiento fenotípico también hizo variar el diagnóstico final en tres pacientes con CLOVES. Dos pacientes (TSR037 y TSR053) fueron reclasificados como fenotipo solapante CLOVES/MCAP, y ambos presentaban una variante patogénica en *PIK3CA*. En un tercer paciente se detectó una variante patogénica en el gen *PTEN*, reclasificándolo dentro de los trastornos relacionados con *PTEN* (PHTS). En sentido contrario, un paciente con diagnóstico clínico inicial de DCMO desarrolló durante el transcurso de este proyecto un sobrecrecimiento lipomatoso característico de CLOVES, y el estudio molecular detectó la presencia de una variante patogénica en el gen *PIK3CA*, por lo que se sumó al grupo de diagnóstico CLOVES.

El primero de los pacientes con solapamiento fenotípico CLOVES/MCAP (TSR037), inicialmente fue diagnosticado clínicamente como Síndrome de Klippel-Trenaunay (KTS) severo, una entidad que frecuentemente ha sido utilizada como un diagnóstico genérico del que recientemente un porcentaje amplio de casos son reclasificados como PROS y presentan variantes patogénicas en *PIK3CA*. Sin embargo, no está claro que los pacientes con características clínicas estrictamente asociadas a KTS presenten mutaciones en *PIK3CA*, por lo que su inclusión en el espectro PROS sigue siendo un tema controversial en la comunidad científica. Este paciente, debido al solapamiento fenotípico, fue posteriormente diagnosticado clínicamente en 2008 en nuestro centro como MCAP, cambiando nuevamente su diagnóstico clínico a CLOVES en 2011, para finalmente ser reclasificado durante el transcurso de este proyecto como fenotipo solapante CLOVES/MCAP. El paciente presenta características típicas de MCAP como son macrocefalia con hemimegalencefalia derecha (sin crisis), retraso del desarrollo psicomotor, hipertelorismo, asimetría facial derecha, hemihipertrofia derecha, polidactilia postaxial en pie derecho y sindactilia bilateral, así como hipotonía. Sin embargo, el tipo de afectación vascular, la presencia de *sandal gap* (mayor separación entre los dedos primero y segundo en los pies), la hipertrofia de miembro inferior derecho con mayor volumen de los diferentes grupos musculares, y sobretudo el aumento homogéneo del tejido celular subcutáneo, hace que clínicamente también tenga un fenotipo compatible con CLOVES. La variante *PIK3CA*:c.1132T>C;p.Cys378Arg presente en este paciente, se detectó en un 1%

(6/584) de las lecturas de NGS en muestra ADN extraído de sangre, y un 10% (6/66) en muestra de ADN extraído de tejido embebido en parafina. El tejido se trataba, según la descripción histológica, de una malformación vascular Glut1 negativo con aumento del componente linfático.

El segundo caso reclasificado como CLOVES/MCAP, corresponde a una paciente de cinco años, que presentó la variante *PIK3CA*:p.Glu453Lys en un 7% (30/420) de las lecturas de NGS en muestra de saliva y un 7% (36/521) en piel. No se disponía de muestra de sangre de este paciente. Al igual que en el caso anterior, presentaba características típicas de MCAP (Figura 24) como son macrocefalia, asimetría facial derecha, frente prominente, malformación capilar extensa, sindactilia, hiperlaxitud articular, hipotonía y anomalías del sistema nervioso (ventriculomegalia, polimicrogiria bilateral extensa y herniación de las amígdalas cerebelosas), así como hemihipertrofia derecha con aumento del miembro inferior izquierdo y anomalías vasculares (aorta abdominal estrecha), más típicas de pacientes con CLOVES.

Otro paciente con diagnóstico clínico previo de CLOVES fue reclasificado como PHTS (141) al identificarse en muestra de ADN de sangre periférica una variante patogénica en el 26,7% (72/269) de las lecturas de NGS del gen *PTEN* (c.388C>T;p.Arg130*). Aunque algunas características de este paciente, como las malformaciones vasculares o la presencia de lipomas hacían pensar en CLOVES, es cierto que la revisión minuciosa del fenotipo del paciente podría haber incluido desde el inicio a *PTEN* dentro del diagnóstico diferencial. Este caso ejemplifica la dificultad diagnóstica basada únicamente en características clínicas entre patologías causadas por mutaciones en genes dentro de la ruta molecular PI3K/AKT/mTOR.

Continuando con los resultados obtenidos en el estudio molecular realizado, y centrándose especialmente en las variantes en *PIK3CA* detectadas en muestras de sangre de los pacientes, es interesante el hecho de que únicamente un paciente mostró variantes en heterocigosis en este gen en muestra de sangre periférica. Se trataba de un paciente con MCAP que falleció a los tres meses de edad. El cuadro clínico de este paciente fue severo desde el momento de su nacimiento: amniorrexis intraoperatoria y aspiración de meconio, intubación orotraqueal por dificultad respiratoria progresiva, quilotórax, macrocefalia, dismorfia facial con aspecto tosco y frente amplia, un cutis reticular llamativo pero sin malformación capilar clara, sobrecrecimiento generalizado más evidente en manos y pies, anomalías de la migración neuronal, polimicrogiria, retraso global del desarrollo, malformación cardíaca compleja, hernia inguinal, hepatoesplenomegalia e hipotiroidismo. El estudio

molecular en el paciente permitió la detección de la variante *PIK3CA*:c.3104C>T;p.Ala1035Val en el 41,6% (119/286) de las lecturas de NGS en muestra de sangre y del 54,9% (166/302) en células cultivadas procedentes de piel. Esta variante, clasificada como patogénica o probablemente patogénica según los diferentes predictores bioinformáticos de patogenicidad, ha sido previamente descrita en dos pacientes que cumplen con los criterios diagnósticos para MCAP (20). No existen estudios que comparen cuantitativamente el efecto de ganancia de función de la variante *PIK3CA*:c.3104C>T;p.Ala1035Val con respecto a la variante *PIK3CA*:c.3140A>G;p.His1047Arg, la más frecuente en PROS y cáncer, y considerada como la de mayor efecto de ganancia de función. Sin embargo, la detección por primera vez de una variante en heterocigosis en muestra de sangre y tejido en un paciente con diagnóstico de MCAP con afectación severa y, fallecido a los 3 meses de vida, soporta la hipótesis de que algunas variantes constitutivas y de ganancia de función de *PIK3CA* no son compatibles con la vida.

Por otro lado, dos pacientes con diagnóstico de CLOVES/MCAP y otro con CLOVES, respectivamente, presentaron variantes en *PIK3CA* detectables en sangre. El primero (TSR037) ya se ha discutido previamente. El segundo de ellos (TSR035), con diagnóstico CLOVES, presentaba malformaciones vasculares múltiples, diseminadas, y reticuladas en tronco y extremidades, sobrecrecimiento parcial más notorio en miembros superiores (principalmente manos) y de miembros inferiores de predominio derecho (con +1cm de longitud en miembro inferior derecho), malformaciones linfáticas en zona cervical y clavicular derechas y en tórax, así como en el mesenterio del intestino delgado con componente principalmente multiquistico. Además presentaba sindactilia de los dedos dos y tres del pie derecho, y *sandal gap* en el mismo pie, así como pies grandes y carnosos, compatible con sobrecrecimiento de tipo lipomatoso. El paciente presentó la variante *PIK3CA*:c.1357G>A;p.Glu453Lys en el 36% (145/400) de lecturas en una muestra de malformación linfática, 36% (99/275) en muestra de lipoma y 2% (19/875) en sangre. El bajo porcentaje detectado en sangre podría haberse confundido con un artefacto de la técnica de no haber contado con los tejidos afectados. Asimismo, la posterior validación realizada en dicha muestra mediante la técnica ddPCR confirmó la variante en mosaico del 1%. De esta forma, se trata del primer paciente con diagnóstico de Síndrome CLOVES y una variante patogénica en *PIK3CA* detectada en sangre. La variante detectada en este paciente está descrita tanto en cáncer como en otros pacientes del espectro PROS (Tabla 13), y los estudios funcionales descritos en la literatura demuestran su efecto de ganancia de función (124, 127).

Tanto las reclasificaciones en el diagnóstico clínico de los pacientes como la detección de los casos inusuales anteriormente descritos, han sido posibles gracias a la implementación del diagnóstico molecular y a la mejor delineación de los diferentes fenotipos dentro del espectro PROS desarrollados en esta tesis, dos puntos sobre los que se profundizará un poco más a continuación. El estudio molecular mediante la técnica de NGS se realizó en 85 pacientes de los cuales se disponía de algún tipo de muestra de ADN, obteniendo un resultado positivo en 47 de ellos (55,3%) (Figura 13) y negativo en un 44,7% que podría deberse al solapamiento fenotípico con otras patologías o a la implicación de genes no descritos previamente. Estas cifras han sido calculadas a partir de los 85 pacientes incluidos en el estudio molecular, independiente de si se disponía de muestra de ADN de tejido afecto o no, dato importante al estudiar patologías asociadas a mosaicismo somático, en las que la búsqueda de mutaciones únicamente a partir de muestra de sangre suele ser infructuosa y el estudio de tejido afecto se hace necesario (42, 65). De hecho, cuando tenemos en cuenta únicamente pacientes con muestra de tejido afecto, este porcentaje aumenta hasta el 70,5% (36/51). Este aumento es generalizado para el espectro PROS en su conjunto, pero muestra resultados diferenciales según la patología específica. Por ello, se analizaron los porcentajes con respecto al total de pacientes de cada grupo (Figura 14). El rendimiento diagnóstico fue del 57,7% (15/26) en MCAP, 100% (3/3) en MCAP/CLAPO, 60% (12/20) en CLOVES, 100% (2/2) en CLOVES/MCAP, 27,8% (5/18) en PROS inespecífico y del 57,1% (4/7) en macrodactilia; cifras que aumentan al 69,2% en MCAP (9/13), 85,7% (12/14) en CLOVES y 80% (4/5) en macrodactilia, cuando sólo tenemos en cuenta pacientes con muestra de tejido afecto disponible (Figura 14).

Si por el contrario, se analiza nuestra cohorte teniendo en cuenta sólo las variantes detectadas (estableciendo en 5% el umbral inferior de confianza para la detección de mosaicos bajos por NGS) en muestras disponibles de sangre y/o saliva, el rendimiento diagnóstico sería del 38,5% (10/26) en MCAP, y 0% en CLOVES (0/20) y macrodactilia (0/6). Asimismo, seis de los pacientes MCAP con variante detectada en sangre no disponían de muestra de tejido afecto, haciendo un total de 23% (6/26) de pacientes diagnosticados molecularmente sin necesidad de este tipo de muestra. Por tanto, nuestros datos indican que de forma prospectiva en un 38,5% de los pacientes con MCAP podría llegarse a una confirmación molecular sin recurrir al uso de muestras de tejido obtenidos con métodos invasivos. Asimismo, en otros estudios publicados en la literatura científica, como el trabajo de Mirzaa y col. (89), el porcentaje de pacientes con variante detectada en este tipo de muestra es similar (39,7%). Esto nos permite recomendar el uso de sangre y/o saliva para realizar el estudio molecular diagnóstico en aquellos pacientes

con características compatibles con MCAP y de los que no se dispone de una muestra de tejido afecto obtenida durante procedimiento quirúrgico programado como parte del tratamiento de rutina, evitando así la solicitud expresa e innecesaria de biopsias cutáneas con fines diagnósticos.

La detección de las variantes en mosaicos bajos en muestras de sangre, ha sido posible gracias a la evolución de la tecnología de secuenciación masiva que permite obtener un mayor número de lecturas de la secuencia en estudio, y por lo tanto una mayor sensibilidad en la búsqueda de mosaicos bajos. Aun así, en las muestras de sangre y saliva los porcentajes de lecturas del alelo alternativo frente al total suelen ser bajos (Tabla 13), por lo que se requieren grandes profundidades de lecturas totales. Con los resultados obtenidos en este estudio (Tablas 11 y 12) se estima que el mínimo recomendable de profundidad de lectura sea de 500x para este tipo de patologías causadas por mutaciones somáticas.

Por otro lado, las razones por las que la detección de variantes patogénicas en muestras de sangre sea un hecho tan excepcional en CLOVES, una patología con una amplia afectación y distribución corporal, está aún por ser esclarecido. Sin embargo, probablemente esté relacionado con el momento del desarrollo en el que se produce la mutación y con el origen embriológico de las células afectadas. Esto lleva a uno de los grandes retos en el futuro de la investigación sobre el espectro PROS, el hecho de que hasta la fecha no se conocen realmente los tipos celulares afectados y su porcentaje relativo dentro de cada uno de los fenotipos incluidos en el espectro PROS. Aunque el aislamiento de todos y cada uno de los tipos celulares que componen un tejido afectado es una tarea actualmente muy compleja, este tipo de aproximación podría mejorar el conocimiento en cuanto a las diferencias fenotípicas en PROS y tener consecuencias en cuanto al seguimiento y manejo de los pacientes.

Asimismo, el porcentaje de lecturas de NGS para el alelo alternativo obtenidas en las diferentes muestras estudiadas varía en función de la patología específica dentro del espectro PROS (Tabla 13 y Figura 15). En el caso de ADN extraído de linfocitos de sangre periférica, los porcentajes obtenidos están por debajo del 20% en todos los casos (Figura 15), salvo en uno (TSR031), comentado anteriormente por presentar la variante en heterocigosis en muestra de sangre. En el caso de las muestras de saliva, se mantiene la misma tendencia, aunque con porcentajes algo mayores, que van desde el 1% hasta el 35% de lecturas del alelo alternativo en NGS, si bien en su mayoría están por debajo del 20%. Nuevamente, la mayor parte de los pacientes tiene diagnóstico de MCAP, aunque la presencia de pacientes con diagnóstico de

PROS no específico se hace más notable. Por otro lado, en el paciente TSR053 con diagnóstico de CLOVES/MCAP, ya discutido más arriba, también se detectó la variante en el 7% (30/429) de lecturas en muestra de saliva. Por último, en tejido afecto se puede observar que el rango de mosaicismo es mucho más amplio, abarcando porcentajes desde el 1 al 50%. La distribución fenotípica en este caso es muy amplia, y la muestra con el mayor porcentaje de lecturas del alelo alternativo corresponde al paciente MCAP previamente comentado por presentar la mutación en el 50% de las lecturas en muestras de sangre.

Un resultado a resaltar en este trabajo es el obtenido del estudio de los pacientes con diagnóstico de DCMO, caracterizado por la presencia de malformación capilar reticulada, extensa y difusa e hipertrofia proporcionada. Esta patología, definida en 2013 (105), es de causa desconocida, y presenta un patrón de afectación compatible con el mosaicismo somático, razón por la cual se decidió incluir en este estudio cinco pacientes con este diagnóstico. Como se mencionó anteriormente, uno de los pacientes con DCMO fue reclasificado como CLOVES, debido al posterior desarrollo de sobrecrecimiento lipomatoso. De los cuatro pacientes restantes disponíamos de tejido afecto de tres. De éstos, dos obtuvieron un resultado negativo en el estudio por NGS y en el tercero se detectó la variante *PIK3CA*:c.241G>A;p.Glu81Lys en el 5% (33/695) de lecturas en muestra de saliva y 10% (9/88) en tejido afecto (Tabla 13). Esta variante ha sido descrita previamente como causante de patología por la hiperactivación de la ruta PI3K/AKT/mTOR en pacientes con diagnóstico de MCAP (103). Clínicamente, el paciente presenta lesiones vasculares reticuladas congénitas, con una disposición parcheada y extensa, afectando a rodillas, cadera-lumbar izquierda, hemitórax izquierdo, hemiabdomen derecho (respetando la línea media como se ha descrito para esta entidad-Figura 9), ingle derecha y mitad superior de la espalda bilateral. No tiene afectación facial pero sí sobrecrecimiento en hemiabdomen derecho, separación entre el primer y segundo dedo del pie (*sandal gap*) leve y lúnulas azuladas. No presenta características que indiquen un diagnóstico clínico de CLOVES ni de MCAP. Sin embargo, debemos ser cautos teniendo en cuenta el otro paciente DCMO que fue reclasificado como CLOVES por desarrollar posteriormente crecimiento lipomatoso. Con todos estos datos, se puede decir que se trata de la primera detección de una variante somática patogénica en un paciente con diagnóstico de DCMO. El hecho de que el gen involucrado sea *PIK3CA* sugiere que DCMO podría ser parte del espectro PROS, tal vez como un fenotipo previo al desarrollo de CLOVES. De confirmarse esta hipótesis con un número mayor de pacientes, tendría implicaciones tanto para el diagnóstico como para el seguimiento y asesoramiento genético de los pacientes con DCMO.

Por otro lado, en cuanto al tipo de variantes, en nuestro estudio se detectaron 23 variantes diferentes en *PIK3CA*, localizadas a lo largo de la proteína (Figura 16), aunque mayoritariamente (39,1%, 9/23) en el dominio quinasas, al igual que ocurre en otros estudios publicados (65, 89, 142). Aunque no hay una asociación directa entre la localización de la variante y el fenotipo, el espectro de mutaciones en MCAP es más amplio, mientras que en el resto del espectro las variantes suelen estar más limitadas a los mismos *hot spots* asociados a cáncer (89). Esta tendencia se mantiene en nuestra cohorte, y además, haciendo referencia a la clasificación de variantes propuesta por Gymnopoulos (30) según su efecto de ganancia de función, en nuestra cohorte los pacientes con diagnóstico de CLOVES presentaron una alta frecuencia de variantes oncogénicas de ganancia de función fuerte (*PIK3CA*:c.1258T>C;p.Cys420Arg y *PIK3CA*:c.1634A>G;p.Glu545Gly) o intermedia (tres pacientes con la variante *PIK3CA*:c.1357G>A;p.Glu453Lys y uno con la variante *PIK3CA*:c.3140A>G;p.His1047Tyr), mientras que en los pacientes con MCAP la distribución fue más amplia (Figura 16).

Las tres variantes más comunes en nuestra cohorte fueron *PIK3CA*:c.3140A>G;p.His1047Arg (un paciente con diagnóstico de MCAP, tres con CLOVES y tres con macrodactilia), *PIK3CA*:c.1357G>A;p.Glu453Lys (tres con CLOVES, uno con MCAP/CLAPO, uno con CLOVES/MCAP y uno con PROS) y *PIK3CA*:c.2176G>A;p.Glu726Lys (cuatro pacientes con MCAP). El hecho de que la variante *PIK3CA*:c.1357G>A;p.Glu453Lys aparezca en dos pacientes con solapamiento fenotípico entre síndromes con un amplio espectro de características clínicas, la hace una candidata interesante para futuros estudios que busquen esclarecer las diferencias fenotípicas que caracterizan a cada una de las entidades que componen el espectro PROS.

Todas las variantes detectadas en nuestros pacientes, con la excepción de *PIK3CA*:c.344G>C;p.Arg115Pro, han sido descritas previamente -a nivel somático- en pacientes con cáncer (Tabla 13). Aunque en los síndromes de sobrecrecimiento generalizado hay una mayor frecuencia de desarrollar tumores (143), en los sobrecrecimientos segmentarios asociados a *PIK3CA*, la frecuencia no parece ser especialmente alta en general, con excepción del tumor de Wilms descrito en varios pacientes con CLOVES (144, 145), con un riesgo estimado del 1,6% (144). En nuestro estudio, ninguno de los pacientes ha desarrollado tumor de Wilms. Recientemente, se ha sugerido utilizar ADN extraído de orina como biomarcador para la detección de nefroblastomatosis o tumor de Wilms en el espectro PROS (146, 147), lo cual podría ser de utilidad en el futuro tanto para la evaluación de riesgo tumoral en estos

pacientes como para su uso alternativo como muestra no invasiva con capacidad diagnóstica. Dados los beneficios de la detección temprana de tumores de Wilms, se recomienda el seguimiento con ecografía abdominal-renal cada 3 meses hasta los 7 años en pacientes con CLOVES (145).

Numerosos estudios han demostrado el efecto sobreactivador de las variantes en *PIK3CA* sobre la vía celular PI3K/AKT/mTOR (30, 32, 40, 103, 124, 127, 128, 148, 149). En esta tesis se han identificado 23 variantes diferentes en *PIK3CA* (Figura 16) y en 14 de ellas se ha demostrado previamente su efecto de ganancia de función (GOF). En otras cuatro variantes (c.344G>C;p.Arg115Pro, c.1133G>A;p.Cys378Tyr, c.1637A>T;p.Gln546Leu, c.1638G>T;p.Gln546His) la GOF ha sido demostrada en diferentes cambios de nucleótido en el mismo codón (c.344G>T;p.Arg115Leu (150), c.1132T>C;p.Cys378Arg (130), c.1636C>A;p.Gln546Lys (30)), y otras cuatro variantes (c.2816A>G;p.Asn939Gly, c.3061T>C;p.Tyr1021His, c.3062A>G;p.Tyr1021Cys, c.3104C>T;p.Ala1035Val) ya han sido descritas como causantes de patología, aunque sin estudios funcionales confirmatorios (20, 65, 89). Por último, la variante c.2726T>G;p.Phe909Cys no había sido descrita en ningún paciente con PROS.

Nuestros estudios funcionales sobre las variantes *PIK3CA*:c.2726T>G;p.Phe909Cys, *PIK3CA*:c.344G>C;p.Arg115Pro, *PIK3CA*:c.3061T>C;p.Tyr1021His y *PIK3CA*:c.3062A>G;p.Tyr1021Cys, mostraron una tendencia variable de incremento de ganancia de función, que sin embargo sólo fue estadísticamente significativa ($p<0.05$) para la variante *PIK3CA*:c.3140A>G;p.His1047Arg utilizada como control positivo (Figura 18). Esto tal vez podría solventarse con la realización de transfecciones estables en vez de transitorias, o con el estudio directo en células de los pacientes en vez de usar modelos celulares. Sin embargo, ya que estas cuatro variantes se consideran como patogénicas o probablemente patogénicas según los criterios establecidos por el Colegio Americano de Genética Médica (ACMG), esto también podría estar confirmando que el aumento de actividad de *PIK3CA*, causado por todo el amplio espectro de variantes detectadas tanto en PROS como en cáncer, no es una variable dicotómica sino una variable cuantitativa, cuyos efectos dependen no sólo de la intensidad propia de su efecto activador, sino que también del porcentaje, tipo y localización de células y tejidos afectados en cada individuo. Actualmente es difícil establecer umbrales tanto en el grado cuantitativo de ganancia de función de la proteína como del nivel de mosaicismo, que permitan determinar la presencia, severidad y naturaleza del fenotipo en

un paciente, consideraciones aplicables al espectro PROS, pero que tiene implicaciones en patologías causadas por mosaicismo somático en genes diferentes a *PIK3CA*.

Además de la variante en *PTEN* comentada anteriormente, se detectaron variantes en otros dos genes diferentes a *PIK3CA*: *AKT3* y *mTOR*. Se detectó una variante en el dominio quinasa del gen *AKT3* (c.863C>T;p.Thr288Ile) (Figura 19) en un paciente con diagnóstico de MCAP (Figura 25). Hasta la fecha, nueve variantes diferentes en *AKT3* han sido identificadas en 25 pacientes con hemi/megalencefalia y/o displasia cortical segmentaria (20, 31, 40, 41, 137, 151-155). En uno de los casos se detectó la variante constitutiva *AKT3*:c.686A>G;p.Asn229Ser (localizada en el dominio quinasa) en un paciente diagnosticado como compatible MCAP (151), aunque las únicas características extra-craneales que describían eran cutis marmorata de las extremidades distales e hiperextensibilidad de la piel, con lo que el diagnóstico de MCAP no parecía claro. En 20 de los casos descritos se detectaron ocho variantes diferentes en forma constitutiva. Los cinco restantes eran casos de mosaicismo somático, ninguno con diagnóstico de MCAP, en los que la variante detectada siempre fue *AKT3*:c.49G>A;p.Glu17Lys, no detectada en muestras de sangre o saliva. La variante que se describe en esta tesis (*AKT3*:c.863C>T;p.Thr288Ile), no descrita en ninguna base de datos de población control, cáncer o pacientes con PROS, fue detectada en el 24% (59/246) de las lecturas por NGS en muestra de piel, 21% (49/232) en saliva y 1% (5/775) en sangre (Figura 20), por lo que se trata del primer caso de un paciente MCAP con una variante en *AKT3* en mosaico. Clínicamente, el paciente presentaba macrocefalia, frente prominente, hipertelorismo, malformación capilar en filtrum y en rodilla derecha, sindactilia de los dedos dos y tres en los pies, hipotonía leve, y una dismetría del miembro inferior izquierdo con acortamiento de este, además de numerosas anomalías cerebrales como son alteración de surcos corticales en hemisferio izquierdo, polimicrogiria, cavum septum pellucidum y cavum vergae, ventriculomegalia supratentorial, descenso mínimo de amígdalas cerebelosas, e hidrocefalia; siendo todas estas características compatibles con MCAP.

Por otro lado, se identificaron tres variantes diferentes en el gen *mTOR* en cuatro pacientes de tres familias diferentes. Tres de estos pacientes tenían un diagnóstico inicial de MCAP (Figura 26 - P2, 3 y 4) mientras que el último (Figura 26 - P1) tenía un diagnóstico de macrocefalia y discapacidad intelectual. La posterior revisión de la historia clínica de cada uno de los pacientes (Tabla 15), así como una revisión bibliográfica de los 23 pacientes descritos en la literatura con mutaciones en el gen *mTOR* y características similares, permitió reclasificar estos cuatro pacientes como Síndrome de Smith-Kingsmore (MIM # 616638) y, a su vez,

publicar la primera revisión de todos los aspectos clínicos y moleculares de esta enfermedad poco frecuente con sólo 27 casos descritos hasta la fecha (22) (Artículo científico incluido en Anexo III).

Las principales características clínicas de SKS son discapacidad intelectual (92,3%), macrocefalia/megalencefalia (88,9%) y epilepsia (73,9%). Las características no neurológicas son también comunes, aunque debido a que los 23 pacientes previamente descritos provienen de series de pacientes con epilepsia focal, discapacidad intelectual, anomalías del cerebro y megalencefalia o hemimegalencefalia, puede que dichas características estén siendo infravaloradas. Gracias a este trabajo, se ha podido establecer al SKS como un cuadro sindrómico específico y clínicamente distinguible. Sin embargo, como tres de nuestros cuatro pacientes fueron remitidos a nuestro centro con diagnóstico de MCAP, la búsqueda de variantes patogénicas en *mTOR* debe ser considerada en pacientes con solapamiento fenotípico con el espectro PROS.

Las variantes descritas en *mTOR* en pacientes con SKS también causan ganancia de función de la ruta PI3K/AKT/mTOR, y están distribuidas a lo largo de todo el gen, siendo frecuentes en el dominio FAT de la proteína, especialmente la variante *mTOR*:c.5395G>A;p.Glu1799Lys (Figura 21) detectada en un 48,1% (13/27) de los pacientes con SKS. Estudios funcionales han demostrado que las variantes en este dominio, especialmente la variante *mTOR*:c.4448G>A;p.Cys1483Phe detectada en 3/27 pacientes SKS, parecen disminuir la unión de mTOR con su inhibidor endógeno Deptor, lo que sugiere que podrían estar incrementando la actividad de mTOR a causa de un descenso de su inhibición (156). Dicha variante, *mTOR*:c.4448G>A;p.Cys1483Phe (Figura 21), fue identificada en uno de nuestros pacientes (TSR023) en el 2% (12/720) de las lecturas en muestra de sangre, 11% (39/341) en saliva, 18% (detectado por pirosecuenciación) en piel hiperpigmentada y 28% (76/268) en piel hipopigmentada (Figura 22).

Por otro lado, en SKS el mosaicismo gonadal tanto de origen paterno como materno, parece ser común (9/27 casos). En esta tesis doctoral, la variante *mTOR*:c.6605T>G;p.Phe2202Cys (Figura 21) fue detectada en muestra de sangre de dos hermanos con diferente edad (Tabla 15), y no fue detectada en muestra de sangre de los padres ni en muestra de espermatozoides del padre, por lo que se sospecha de un mosaicismo gonadal de origen materno. Por tanto, mutaciones germinales (ya sean *de novo*, heredadas de padres afectados o debidas a mosaicismo gonadal) están presentes en el 92,6% de los pacientes con SKS,

mientras que el porcentaje restante de pacientes presenta mutaciones en forma de mosaico en todos los tejidos, lo cual tiene importantes implicaciones tanto para el correcto diagnóstico molecular (las técnicas tradicionales no detectan niveles bajos de mosaicismo) como para el consejo genético (por ejemplo, riesgo de recurrencia o seguimiento). Este trabajo también permitió sugerir el uso del término “mosaicismo constitutivo” para referirse a aquellas variantes constitutivas presentes en forma de mosaico, es decir, presentes en todos los tipos celulares pero no en el 100% de las células (22).

5.2 Desarrollo de un protocolo experimental y diagnóstico

En cuanto a los retos asociados al diagnóstico molecular en PROS, uno de los principales desafíos del mosaicismo somático es la detección de variantes patogénicas, ya que se necesita estudiar el tejido afecto, lo cual ya es una limitación. La definición de tejido afecto no es trivial ya que no siempre es posible predecir el número de células con la mutación que conforman una malformación específica. Lo ideal sería obtener una muestra de tejido con malformación como parte del tratamiento de rutina, pero a menudo esto no es posible, por lo que es necesario obtener biopsias de la piel, un procedimiento invasivo indeseable. Afortunadamente, como se ha comentado anteriormente, en algunos pacientes es posible la detección de variantes patogénicas en muestras obtenidas por procedimientos no invasivos.

Otro de los grandes desafíos en el diagnóstico de mosaicos bajos es que, aunque hay varios enfoques bioinformáticos para detectar variantes somáticas en los datos derivados de NGS, estos están diseñados principalmente para la detección de variantes en cáncer y no para el estudio de trastornos del desarrollo en mosaico, y el contexto genómico es diferente. Por ello, en este trabajo se diseñó un enfoque propio para solucionar el problema. Una aproximación bioinformática que ha demostrado ser útil para el estudio de variantes en mosaicos bajos tanto para el estudio de la cohorte de pacientes de esta tesis como para la detección por primera vez de variantes somáticas en el gen *PIK3CA* en pacientes con CLAPO (93). Gracias al enfoque bioinformático aplicado, se pudo mantener las lecturas con baja calidad de mapeo debido a un alto porcentaje de identidad con otras regiones genómicas (que con un protocolo para variantes constitutivas se hubieran descartado), así como anotar variantes representadas de forma diferencial según el tipo de muestra estudiado, permitiendo identificar la variante causal en 24 de los 47 (51%) pacientes con diagnóstico molecular positivo en los cuales el protocolo bioinformático para variantes constitutivas no las detectó. Esta herramienta bioinformática está mejorando actualmente su desarrollo con nuevas

muestras asociadas a mosaicismo somático y será presentada en una publicación científica próximamente.

Por otro lado, debido a la existencia de una región de alta homología en el cromosoma 22 con los exones del 10 al 14 en *PIK3CA*, aunque el panel de genes de NGS y el protocolo bioinformático empleados en este trabajo parecen discriminar correctamente entre estas dos regiones, en caso de detectar variantes mediante NGS en esta región, se recomienda confirmar la localización de estas en el gen mediante la realización previa de *Long Range*-PCR o la utilización de oligonucleótidos que abarquen polimorfismos específicos de *PIK3CA* haciéndolos específicos para él, en el caso de validar las variantes mediante pirosecuenciación o secuenciación Sanger. Asimismo, ha de ponerse especial atención si se detectan las variantes en *PIK3CA*: c.1634A>C;p.Glu545Ala, c.1658_1659GT>C;p.S553fs*7, c.1837G>A;p.Gly613Ser, c.1850G>A;p.Arg617Gln, c.1876G>A;p.Asp626Asn, c.2038G>C;p.Val680Leu y c.2155C>G;p.Leu719Val, ya que aunque existen estudios científicos publicados describiendo algunas de estas variantes (c.1634A>C;p.Glu545Ala y c.1658_1659GT>C;p.S553fs*7) como causantes de patología (125), cuyo nucleótido alternativo coincide con el nucleótido correspondiente a la región de alta homología en el cromosoma 22, y por tanto, se ha de verificar su localización en *PIK3CA*.

Debido al amplio solapamiento fenotípico observado en nuestra cohorte de pacientes, así como a los diferentes rangos de mosaicismo somático dependiendo del tipo de muestra estudiado, se recomienda un protocolo diagnóstico para pacientes con diagnóstico presuntivo de PROS basado en la utilización de NGS con coberturas profundas (>500x), analizando todos los genes implicados en el diagnóstico diferencial, y por tanto en la ruta PI3K/AKT/mTOR. En los pacientes MCAP sin muestra de tejido afecto disponible, se recomienda utilizar inicialmente muestra de sangre y/o saliva, y solicitar biopsia de tejido afecto sólo si el resultado es negativo en estas muestras. En el resto de patologías dentro del espectro PROS sigue siendo necesario actualmente el uso de tejido afecto.

Asimismo, haciendo un balance de los resultados obtenidos con los diferentes métodos de validación de variantes en mosaico, cabe destacar que los porcentajes de mosaicismo obtenidos mediante la técnica de ddPCR son más consistentes con los encontrados en NGS, en comparación con la técnica de pirosecuenciación (Tabla 13). Esta última, es más efectiva cuando se están estudiando variantes presentes por encima del 7% de lecturas obtenidas por NGS, mientras que la ddPCR permite detectar mosaicos inferiores al 1%.

El protocolo diagnóstico más eficiente sería la combinación de NGS con una profundidad de lecturas elevada y una posterior validación de las variantes en mosaico por ddPCR. Sin embargo, debido a la escasa disponibilidad y el elevado precio de la ddPCR en la práctica clínica, parece adecuado una primera validación de las variantes mediante pirosecuenciación, técnica más accesible, y en caso de no obtener resultados concluyentes optar por la ddPCR, o incluso un segundo panel de genes de NGS diferente al inicial, preferiblemente realizado con una plataforma experimental diferente.

En este trabajo, la revisión de las características clínicas de los pacientes, así como su codificación y tabulación estandarizada utilizando términos HPO, ha permitido delinear mejor el fenotipo PROS. En términos generales, las frecuencias de presentación de las diferentes características clínicas para MCAP y CLOVES en nuestra cohorte coinciden con las ya descritas en la literatura (Tabla 14). Sí es destacable la presencia de sindactilia y anomalías de la piel (manchas café con leche y nevus) en tres pacientes con macrodactilia, lo que podría estar indicando que no siempre se trata de una alteración aislada, y que en algunas ocasiones podría coexistir con formas menos evidentes de otras alteraciones asociadas al espectro PROS. Si a esto sumamos el amplio grupo de pacientes en esta cohorte cuyo diagnóstico clínico fue modificado, además de los pacientes que fueron clasificados como fenotipos solapantes (tres MCAP/CLAPO, y dos CLOVES/MCAP), es cuando surge la pregunta de si es o no apropiado mantener los nombres originales de cada uno de estos síndromes, o si deberíamos re-clasificarlos a todos bajo el diagnóstico único de PROS (157). Aunque en términos moleculares parece adecuada la clasificación única bajo el término PROS, se considera que el hecho de compartir la causa molecular (variantes en el gen *PIK3CA*) no hace que su antigua clasificación fenotípica sea obsoleta. La identificación temprana de las diferentes anomalías asociadas a cada subtipo tiene implicaciones clínicas, como puede ser la mayor frecuencia de tumores de Wilms en los pacientes con CLOVES; también es útil para que los diferentes especialistas médicos, especialmente los neonatólogos, sean capaces de ofrecer diagnósticos tempranos y realicen estudios complementarios adecuados, y también ayudará en el diagnóstico diferencial de aquellos pacientes con fenotipo similar pero causado por otros genes diferentes a *PIK3CA*, como los descritos en este trabajo, especialmente dentro de la ruta PI3K/AKT/mTOR. Sin duda, se necesitan nuevos sistemas de clasificación que puedan incorporar tanto la expresión clínica como la causa molecular, pero siempre pensando en la utilidad para el paciente.

Por último, aunque no existe ningún tratamiento establecido para pacientes con PROS, los avances en el conocimiento tanto molecular como clínico de estas patologías, hace que

cada vez sean más los estudios que tratan de demostrar la eficacia de fármacos propuestos para cáncer en el tratamiento de pacientes con PROS. El efecto de ganancia de función que tienen las variantes en *PIK3CA*, como en los otros dos genes identificados en esta tesis doctoral (*AKT3* y *mTOR*), sobre la ruta de señalización PI3K/AKT/mTOR pone especial atención en los inhibidores de esta ruta. Para los pacientes con PROS sería apropiado una inhibición selectiva de la isoforma p110 α (*PIK3CA*) que pudiera revertir directamente el defecto molecular, minimizando los efectos secundarios provocados por la inhibición del resto de isoformas (64, 158). Por otro lado, el compuesto ARQ 092, un inhibidor de AKT, ha mostrado resultados prometedores en células y tejidos obtenidos de pacientes con Síndrome Proteus y positivos para la variante *AKT1:c.49G>A;p.Glu17Lys* (159), lo cual podría extrapolarse a pacientes con PROS, en los que también está aumentada la fosforilación de AKT. Finalmente, los inhibidores de mTOR, como el Sirolimus (Rapamicina) o el Everolimus, han mostrado buenos resultados en su uso compasivo para el tratamiento de malformaciones vasculares, incluidas las asociadas a *PIK3CA*, y se está evaluando la efectividad de su uso en la reducción o reversión del sobrecrecimiento funcional en PROS (160).

La combinación de estos avances junto con los estudios clínicos y moleculares presentados en esta Tesis Doctoral, podrán servir de ayuda en un futuro no muy lejano para escoger aquellos pacientes candidatos que puedan obtener un mayor beneficio al ser tratados con este tipo de fármacos.

6. CONCLUSIONES

Tras el estudio de la cohorte de pacientes aquí presentada podemos sugerir las siguientes conclusiones:

1. Este trabajo ha permitido expandir el espectro fenotípico y genotípico de los síndromes de sobrecrecimiento asociados a *PIK3CA* (PROS): se muestra que la reclasificación de pacientes (11 de 96) tanto dentro como fuera del espectro PROS es un hecho frecuente; se describen los primeros casos de solapamiento fenotípico entre MCAP y CLAPO; se ha contribuido a demostrar que las mutaciones somáticas en *PIK3CA* son causantes también de hipoglicemia no cetótica severa; y la detección de una variante en heterocigosis en muestra de sangre y tejido en un paciente con diagnóstico de MCAP con afectación severa y, fallecido a los 3 meses de vida, soporta la hipótesis de que algunas variantes constitutivas y de ganancia de función de *PIK3CA* no son compatibles con la vida.
2. El hecho de compartir una misma causa molecular (*PIK3CA*) hace parecer apropiado en términos moleculares una clasificación única bajo el término PROS. Sin embargo, la clasificación tradicional en subtipos clínicos sigue siendo necesaria para obtener mejores rendimientos diagnósticos, para decidir el mejor tipo de muestra a utilizar en la confirmación molecular, y para una identificación temprana de las diferentes anomalías asociadas a cada patología. Sería necesario proponer una nueva clasificación, consensuada a nivel internacional, que incluya tanto aspectos fenotípicos como moleculares.
3. Se ha observado que el rendimiento diagnóstico en la cohorte de estudio aumenta del 55,7% al 70,5% cuando únicamente se tienen en cuenta los pacientes con muestra de tejido afecto disponible. Sin embargo, también se muestra que en un 38,5% de los pacientes con Macrocefalia-Malformación Capilar se hubiera podido establecer el diagnóstico molecular sin necesidad del uso de muestras de tejido afecto, evitando así la realización de una prueba invasiva. Por ello, se propone específicamente para MCAP un primer estudio molecular en ADN procedente de muestras de sangre y/o saliva, antes de proceder a la obtención de muestra de tejido afecto. Al contrario, en los pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome CLOVES, Macroductilia aislada u otras patologías específicas de tejido incluidas en el Espectro PROS, sigue siendo necesario el uso de tejido afecto para realizar el estudio molecular.
4. Se describe el primer caso de un paciente con diagnóstico de Síndrome CLOVES y variante patogénica en *PIK3CA* detectada en muestra de ADN de linfocitos de sangre periférica. Las razones por las que la detección de variantes patogénicas en muestras de sangre sea un hecho tan excepcional en esta patología con amplia afectación y distribución corporal,

están aún por ser esclarecidas. Sin embargo, probablemente esté relacionado con el momento del desarrollo en el que se produce la mutación y con el origen embriológico de las células afectadas.

5. Por primera vez se ha identificado una variante patogénica en forma de mosaicismo somático en el gen *PIK3CA* en un paciente con diagnóstico de DCMO (*Diffuse Capillary Malformations with Overgrowth*), una entidad clínica con características compatibles con el espectro PROS y de la que no se ha descrito su causa genética hasta la fecha. La descripción de más casos probablemente indicaría la inclusión de DCMO dentro del espectro PROS.
6. Se describe por primera vez un paciente con un claro diagnóstico clínico de PROS y mutación en un gen diferente a *PIK3CA*, al detectarse una variante en forma de mosaico en el gen *AKT3* en todas las muestras estudiadas (sangre, saliva y piel) de un paciente con MCAP.
7. La identificación de tres variantes diferentes en el gen *mTOR* en cuatro pacientes nos ha permitido incluir el Síndrome de Smith-Kingsmore dentro del diagnóstico diferencial del espectro PROS, así como definir los aspectos clínicos y moleculares de esta enfermedad poco frecuente con sólo 27 casos descritos hasta la fecha.
8. Se ha desarrollado un protocolo experimental y bioinformático de secuenciación masiva, que ya se aplica en la práctica clínica de rutina de nuestro centro para el diagnóstico de pacientes con PROS. La herramienta bioinformática específica desarrollada para la detección de mosaicismo somático utilizada en este trabajo permitió detectar la alteración molecular en el 51% de los pacientes que previamente habían resultado negativos utilizando los protocolos de análisis habituales en NGS. Por ello, se demuestra la importancia del uso de algoritmos específicos para la detección de mosaicos bajos en este tipo de patologías. Este protocolo es extrapolable a todas las patologías asociadas a mosaicismo somático.
9. Se propone un protocolo diagnóstico integral para el espectro PROS basado en la utilización de NGS con coberturas profundas (>500x), el uso de algoritmos específicos para la detección de variantes somáticas presentes en mosaicos bajos, el uso de paneles que incluyan todos los genes implicados en la ruta PI3K/AKT/mTOR, la discriminación del tipo de muestra necesaria para el estudio según el diagnóstico clínico dentro del espectro PROS, y la utilización de las metodologías alternativas más adecuadas para la validación de variantes detectadas por NGS.

7. CONCLUSIONS

After the study of the cohort of patients presented herein, we can suggest the following conclusions:

1. This study has allowed the expansion of the phenotypic and genotypic spectrum of the *PIK3CA*-Related Overgrowth Spectrum (PROS). This study shows that the reclassification of patients (11 of 96) both inside and outside PROS spectrum is frequent. We have described the first cases of phenotypic overlap between MCAP and CLAPO. The involvement of *PIK3CA* somatic mutations is demonstrated as responsible of severe non-ketogenic hypoglycaemia. Finally, the detection of a heterozygous variant in blood and affected tissue from a patient with severe MCAP, who died at three months of age, supports the hypothesis that some constitutive and gain-of-function *PIK3CA* variants are not compatible with life.
2. The fact of sharing the same molecular cause (*PIK3CA*) makes it seem appropriate in molecular terms a unique classification under the term PROS. However, the classification in clinical subtypes is still necessary to obtain better diagnosis yields, to choose the most suitable of sample for molecular analysis, and for an early identification of the different anomalies associated to each disease. A new internationally agreed classification, including both phenotypic and molecular aspects, seems necessary.
3. This study shows that the diagnostic efficiency in our cohort increases from 55,7% to 70,5% when only patients with available affected tissue samples are analyzed. However, in 38,5% of the patients with Macrocephaly-Capillary Malformation, the molecular diagnosis could have been achieved without the need of tissue samples obtained by invasive methods. Therefore, before obtaining affected tissue sample, a first molecular study using DNA from blood and/or saliva is proposed specifically for MCAP. Conversely, in patients with CLOVES syndrome, Isolated Macrodactyly or other tissue-specific anomalies, the use of affected tissue is still necessary to perform the molecular study.
4. The first patient diagnosed with CLOVES syndrome and a *PIK3CA* pathogenic variant detected in DNA from blood is described. The reasons why the detection of mutations in blood samples is exceptional in this disease characterized by a generalized distribution, still needs to be clarified. However, it could be related to the time of the development in which the mutation occurs and to the embryological origin of the affected cells.
5. For the first time, a pathogenic somatic variant in the *PIK3CA* gene has been identified in a patient diagnosed with DCMO (Diffuse Capillary Malformations with Overgrowth), a clinical entity with overlapping clinical features with PROS spectrum, and with no genetic cause

described to date. Description of more cases would probably indicate the inclusion of DCMO within the PROS spectrum.

6. This work described for the first time a patient with a clear clinical diagnosis of PROS and non-*PIK3CA* mutation as a somatic variant in the *AKT3* gene was detected in all the studied samples (blood, saliva and skin) in a patient with MCAP.
7. The identification of three different variants in the *mTOR* gene in four patients has allowed us to include Smith-Kingsmore syndrome within the differential diagnosis of PROS spectrum, as well as to define the clinical and molecular aspects of this rare disease with only 27 cases described to date.
8. An experimental and bioinformatic NGS protocol has been developed, which is already applied in the clinical routine of our center for the molecular diagnosis of PROS patients. The specific bioinformatics tool for the detection of somatic mosaicism used in this work allowed us to detect the molecular defect in 51% of the patients with previous negative results using the standard NGS protocol. Therefore, it is necessary to use specific algorithms for the detection of low mosaics in this type of diseases. This protocol can be extrapolated to all the diseases associated with somatic mosaicism.
9. A diagnostic protocol for PROS spectrum is proposed based on: the use of deep coverage NGS (>500x), the use of specific algorithms for the detection of somatic variants in low mosaics, the use of NGS panels including all the genes involved in the PI3K/AKT/mTOR pathway, the selection of the most suitable sample for molecular analysis in each entity within PROS spectrum, and using the appropriate methodologies for the validation of variants detected by NGS.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Neylon OM, Werther GA, Sabin MA. Overgrowth syndromes. *Curr Opin Pediatr*. 2012;24(4):505-11.
2. Blei F. Overgrowth syndromes with vascular anomalies. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2015;45(4):118-31.
3. Weaver DD. Overgrowth Syndromes and Disorders: Definition, Classification, and Discussion. *Growth Genetics & Hormones*. 1994;10.
4. Tenorio Castaño JA. Análisis genómico global en los Síndromes de Sobrecrecimiento: Evaluación de la dosis genómica mediante el uso de microarrays personalizados y estudio de genes candidatos mediante el uso de secuenciación masiva de nueva generación. Madrid, España: Universidad Autónoma de Madrid; 2017.
5. Cohen M, Neri G, Weksberg R. Overgrowth Syndromes. New York: Oxford University Press; 2002. 206 p.
6. McCuaig CC. Update on classification and diagnosis of vascular malformations. *Curr Opin Pediatr*. 2017;29(4):448-54.
7. ISSVA. Classification of Vascular Anomalies Melbourne: International Society for the Study of Vascular Anomalies; 2014 [Available from: issva.org/classification].
8. Vahidnezhad H, Youssefian L, Uitto J. Molecular Genetics of the PI3K-AKT-mTOR Pathway in Genodermatoses: Diagnostic Implications and Treatment Opportunities. *J Invest Dermatol*. 2016;136(1):15-23.
9. Kurek KC, Luks VL, Ayturk UM, Alomari AI, Fishman SJ, Spencer SA, et al. Somatic mosaic activating mutations in PIK3CA cause CLOVES syndrome. *Am J Hum Genet*. 2012;90(6):1108-15.
10. Hauge M, Bruserud O, Hatfield KJ. Targeting of cell metabolism in human acute myeloid leukemia--more than targeting of isocitrate dehydrogenase mutations and PI3K/AKT/mTOR signaling? *Eur J Haematol*. 2016;96(3):211-21.
11. Ramasamy TS, Ayob AZ, Myint HH, Thiagarajah S, Amini F. Targeting colorectal cancer stem cells using curcumin and curcumin analogues: insights into the mechanism of the therapeutic efficacy. *Cancer Cell Int*. 2015;15:96.
12. Temraz S, Mukherji D, Shamseddine A. Dual Inhibition of MEK and PI3K Pathway in KRAS and BRAF Mutated Colorectal Cancers. *Int J Mol Sci*. 2015;16(9):22976-88.
13. Duzgun Z, Eroglu Z, Biray Avci C. Role of mTOR in glioblastoma. *Gene*. 2016;575(2 Pt 1):187-90.
14. Li XY, Wang X. The role of human cervical cancer oncogene in cancer progression. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(6):8363-8.
15. Chang L, Graham PH, Ni J, Hao J, Bucci J, Cozzi PJ, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the treatment of prostate cancer radioresistance. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015;96(3):507-17.
16. Bach LA, Fu P, Yang Z. Insulin-like growth factor-binding protein-6 and cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2013;124(4):215-29.
17. De Santis MC, Sala V, Martini M, Ferrero GB, Hirsch E. PI3K Signaling in Tissue Hyper-Proliferation: From Overgrowth Syndromes to Kidney Cysts. *Cancers (Basel)*. 2017;9(4).
18. Lindhurst MJ, Sapp JC, Teer JK, Johnston JJ, Finn EM, Peters K, et al. A mosaic activating mutation in AKT1 associated with the Proteus syndrome. *N Engl J Med*. 2011;365(7):611-9.
19. Marsh DJ, Kum JB, Lunetta KL, Bennett MJ, Gorlin RJ, Ahmed SF, et al. PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome. *Hum Mol Genet*. 1999;8(8):1461-72.
20. Riviere JB, Mirzaa GM, O'Roak BJ, Beddaoui M, Alcantara D, Conway RL, et al. De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet*. 2012;44(8):934-40.
21. Smith LD, Saunders, C.J., Dinwiddie, D.L. Exome sequencing Reveals De novo Germline Mutation of the Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) in a patient with Megalencephaly and Intractable seizures. *Journal of Genomes and Exomes*. 2013;2:63-72.

22. Gordo G, Tenorio J, Arias P, Santos-Simarro F, Garcia-Minaur S, Moreno JC, et al. mTOR mutations in Smith-Kingsmore syndrome: four additional patients and a review. *Clin Genet*. 2017.
23. Hussain K, Challis B, Rocha N, Payne F, Minic M, Thompson A, et al. An activating mutation of AKT2 and human hypoglycemia. *Science*. 2011;334(6055):474.
24. Tenorio J, Mansilla A, Valencia M, Martinez-Glez V, Romanelli V, Arias P, et al. A new overgrowth syndrome is due to mutations in RNF125. *Hum Mutat*. 2014;35(12):1436-41.
25. Gabelli SB, Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Vogelstein B, Amzel LM. Structural effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;347:43-53.
26. Gabelli SB, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Vogelstein B, Amzel LM. Somatic mutations in PI3Kalpha: structural basis for enzyme activation and drug design. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804(3):533-40.
27. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004;304(5670):554.
28. Forbes SA, Beare D, Boutselakis H, Bamford S, Bindal N, Tate J, et al. COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D777-D83.
29. Carson JD, Van Aller G, Lehr R, Sinnamon RH, Kirkpatrick RB, Auger KR, et al. Effects of oncogenic p110alpha subunit mutations on the lipid kinase activity of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J*. 2008;409(2):519-24.
30. Gymnopoulos M, Elsliger MA, Vogt PK. Rare cancer-specific mutations in PIK3CA show gain of function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(13):5569-74.
31. Lee JH, Huynh M, Silhavy JL, Kim S, Dixon-Salazar T, Heiberg A, et al. De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. *Nat Genet*. 2012;44(8):941-5.
32. Lindhurst MJ, Parker VE, Payne F, Sapp JC, Rudge S, Harris J, et al. Mosaic overgrowth with fibroadipose hyperplasia is caused by somatic activating mutations in PIK3CA. *Nat Genet*. 2012;44(8):928-33.
33. Rios JJ, Paria N, Burns DK, Israel BA, Cornelia R, Wise CA, et al. Somatic gain-of-function mutations in PIK3CA in patients with macrodactyly. *Hum Mol Genet*. 2013;22(3):444-51.
34. Mirzaa G, Conway R, Graham JM, Jr., Dobyns WB. PIK3CA-Related Segmental Overgrowth. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA)1993.
35. Nathan N, Keppler-Noreuil KM, Biesecker LG, Moss J, Darling TN. Mosaic Disorders of the PI3K/PTEN/AKT/TSC/mTORC1 Signaling Pathway. *Dermatol Clin*. 2017;35(1):51-60.
36. Muller CI, Miller CW, Hofmann WK, Gross ME, Walsh CS, Kawamata N, et al. Rare mutations of the PIK3CA gene in malignancies of the hematopoietic system as well as endometrium, ovary, prostate and osteosarcomas, and discovery of a PIK3CA pseudogene. *Leuk Res*. 2007;31(1):27-32.
37. Youssoufian H, Pyeritz RE. Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nat Rev Genet*. 2002;3(10):748-58.
38. Happle R. A rule concerning the segmental manifestation of autosomal dominant skin disorders. Review of clinical examples providing evidence for dichotomous types of severity. *Arch Dermatol*. 1997;133(12):1505-9.
39. Happle R. The Molecular Revolution in Cutaneous Biology: Era of Mosaicism. *J Invest Dermatol*. 2017;137(5):e73-e7.
40. Jansen LA, Mirzaa GM, Ishak GE, O'Roak BJ, Hiatt JB, Roden WH, et al. PI3K/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia. *Brain*. 2015;138(Pt 6):1613-28.
41. Poduri A, Evrony GD, Cai X, Elhosary PC, Beroukhi R, Lehtinen MK, et al. Somatic activation of AKT3 causes hemispheric developmental brain malformations. *Neuron*. 2012;74(1):41-8.

42. Keppler-Noreuil KM, Rios JJ, Parker VE, Semple RK, Lindhurst MJ, Sapp JC, et al. PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. *Am J Med Genet A*. 2015;167A(2):287-95.
43. Freed D, Stevens EL, Pevsner J. Somatic mosaicism in the human genome. *Genes (Basel)*. 2014;5(4):1064-94.
44. Campbell IM, Shaw CA, Stankiewicz P, Lupski JR. Somatic mosaicism: implications for disease and transmission genetics. *Trends Genet*. 2015;31(7):382-92.
45. Happle R. The categories of cutaneous mosaicism: A proposed classification. *Am J Med Genet A*. 2016;170A(2):452-9.
46. Happle R. Mosaicism in human skin. Understanding the patterns and mechanisms. *Arch Dermatol*. 1993;129(11):1460-70.
47. Biesecker LG, Spinner NB. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nat Rev Genet*. 2013;14(5):307-20.
48. Lim YH, Fisher JM, Choate KA. Revertant mosaicism in genodermatoses. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(12):2229-38.
49. Metzker ML. Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res*. 2005;15(12):1767-76.
50. Hert DG, Fredlake CP, Barron AE. Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: a comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *Electrophoresis*. 2008;29(23):4618-26.
51. Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5(7):887-900.
52. Hyman ED. A new method of sequencing DNA. *Anal Biochem*. 1988;174(2):423-36.
53. King CR, Marsh S. Pyrosequencing of clinically relevant polymorphisms. *Methods Mol Biol*. 2013;1015:97-114.
54. Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(9):1296-303.
55. Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc*. 2007;2(9):2265-75.
56. Ronaghi M. Improved performance of pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein. *Anal Biochem*. 2000;286(2):282-8.
57. Langae T, Ronaghi M. Genetic variation analyses by Pyrosequencing. *Mutat Res*. 2005;573(1-2):96-102.
58. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*. 2011;83(22):8604-10.
59. Orhant L, Rondeau S, Vasson A, Anselem O, Goffinet F, Allach El Khattabi L, et al. Droplet digital PCR, a new approach to analyze fetal DNA from maternal blood: application to the determination of fetal RHD genotype. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2016;74(3):269-77.
60. Perlado S, Bustamante-Aragones A, Donas M, Lorda-Sanchez I, Plaza J, Rodriguez de Alba M. Fetal Genotyping in Maternal Blood by Digital PCR: Towards NIPD of Monogenic Disorders Independently of Parental Origin. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153258.
61. Olmedillas-Lopez S, Garcia-Arranz M, Garcia-Olmo D. Current and Emerging Applications of Droplet Digital PCR in Oncology. *Mol Diagn Ther*. 2017;21(5):493-510.
62. Pekin D, Skhiri Y, Baret JC, Le Corre D, Mazutis L, Salem CB, et al. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab Chip*. 2011;11(13):2156-66.
63. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal Chem*. 2012;84(2):1003-11.

64. Keppler-Noreuil KM, Parker VE, Darling TN, Martinez-Agosto JA. Somatic overgrowth disorders of the PI3K/AKT/mTOR pathway & therapeutic strategies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2016;172(4):402-21.
65. Kuentz P, St-Onge J, Duffourd Y, Courcet JB, Carmignac V, Jouan T, et al. Molecular diagnosis of PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS) in 162 patients and recommendations for genetic testing. *Genet Med*. 2017;19(9):989-97.
66. Martinez-Glez V, Romanelli V, Mori MA, Gracia R, Segovia M, Gonzalez-Meneses A, et al. Macrocephaly-capillary malformation: Analysis of 13 patients and review of the diagnostic criteria. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(12):3101-6.
67. Bloom J, Upton J, 3rd. CLOVES syndrome. *J Hand Surg Am*. 2013;38(12):2508-12.
68. Alomari AI. Characterization of a distinct syndrome that associates complex truncal overgrowth, vascular, and acral anomalies: a descriptive study of 18 cases of CLOVES syndrome. *Clin Dysmorphol*. 2009;18(1):1-7.
69. Cohen MM, Jr. Klippel-Trenaunay syndrome. *Am J Med Genet*. 2000;93(3):171-5.
70. Liu NF, Lu Q, Yan ZX. Lymphatic malformation is a common component of Klippel-Trenaunay syndrome. *J Vasc Surg*. 2010;52(6):1557-63.
71. Brandigi E, Torino G, Messina M, Molinaro F, Mazzei O, Matucci T, et al. Combined capillary-venous-lymphatic malformations without overgrowth in patients with Klippel-Trenaunay syndrome. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord*. 2017.
72. Keppler-Noreuil KM, Sapp JC, Lindhurst MJ, Parker VE, Blumhorst C, Darling T, et al. Clinical delineation and natural history of the PIK3CA-related overgrowth spectrum. *Am J Med Genet A*. 2014;164A(7):1713-33.
73. Maclellan RA, Luks VL, Vivero MP, Mulliken JB, Zurakowski D, Padwa BL, et al. PIK3CA activating mutations in facial infiltrating lipomatosis. *Plast Reconstr Surg*. 2014;133(1):12e-9e.
74. Padwa BL, Mulliken JB. Facial infiltrating lipomatosis. *Plast Reconstr Surg*. 2001;108(6):1544-54.
75. Luks VL, Kamitaki N, Vivero MP, Uller W, Rab R, Bovee JV, et al. Lymphatic and other vascular malformative/overgrowth disorders are caused by somatic mutations in PIK3CA. *J Pediatr*. 2015;166(4):1048-54 e1-5.
76. Castiglioni C, Bertini E, Orellana P, Villarroel C, Las Heras F, Hinzpeter D, et al. Activating PIK3CA somatic mutation in congenital unilateral isolated muscle overgrowth of the upper extremity. *Am J Med Genet A*. 2014;164A(9):2365-9.
77. Osborn AJ, Dickie P, Neilson DE, Glaser K, Lynch KA, Gupta A, et al. Activating PIK3CA alleles and lymphangiogenic phenotype of lymphatic endothelial cells isolated from lymphatic malformations. *Hum Mol Genet*. 2015;24(4):926-38.
78. Santos AC, Escorsi-Rosset S, Simao GN, Terra VC, Velasco T, Neder L, et al. Hemispheric dysplasia and hemimegalencephaly: imaging definitions. *Childs Nerv Syst*. 2014;30(11):1813-21.
79. Hafner C, Lopez-Knowles E, Luis NM, Toll A, Baselga E, Fernandez-Casado A, et al. Oncogenic PIK3CA mutations occur in epidermal nevi and seborrheic keratoses with a characteristic mutation pattern. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(33):13450-4.
80. Groesser L, Herschberger E, Landthaler M, Hafner C. FGFR3, PIK3CA and RAS mutations in benign lichenoid keratosis. *Br J Dermatol*. 2012;166(4):784-8.
81. Vahidnezhad H, Youssefian L, Uitto J. Klippel-Trenaunay syndrome belongs to the PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). *Exp Dermatol*. 2016;25(1):17-9.
82. Orphanet. Prevalence of rare diseases: Bibliographic data Orphanet Report Series, Rare Diseases collection. 2018;1.
83. Clayton-Smith J, Kerr B, Brunner H, Tranebjaerg L, Magee A, Hennekam RC, et al. Macrocephaly with cutis marmorata, haemangioma and syndactyly--a distinctive overgrowth syndrome. *Clin Dysmorphol*. 1997;6(4):291-302.

84. Moore CA, Toriello HV, Abuelo DN, Bull MJ, Curry CJ, Hall BD, et al. Macrocephaly-cutis marmorata telangiectatica congenita: a distinct disorder with developmental delay and connective tissue abnormalities. *Am J Med Genet.* 1997;70(1):67-73.
85. Lapunzina P, Gairi A, Delicado A, Mori MA, Torres ML, Goma A, et al. Macrocephaly-cutis marmorata telangiectatica congenita: report of six new patients and a review. *Am J Med Genet A.* 2004;130A(1):45-51.
86. Toriello HV, Mulliken JB. Accurately renaming macrocephaly-cutis marmorata telangiectatica congenita (M-CMTC) as macrocephaly-capillary malformation (M-CM). *Am J Med Genet A.* 2007;143A(24):3009.
87. Conway RL, Pressman BD, Dobyns WB, Danielpour M, Lee J, Sanchez-Lara PA, et al. Neuroimaging findings in macrocephaly-capillary malformation: a longitudinal study of 17 patients. *Am J Med Genet A.* 2007;143A(24):2981-3008.
88. Mirzaa GM, Conway RL, Gripp KW, Lerman-Sagie T, Siegel DH, deVries LS, et al. Megalencephaly-capillary malformation (MCAP) and megalencephaly-polydactyly-polymicrogyria-hydrocephalus (MPPH) syndromes: two closely related disorders of brain overgrowth and abnormal brain and body morphogenesis. *Am J Med Genet A.* 2012;158A(2):269-91.
89. Mirzaa G, Timms AE, Conti V, Boyle EA, Girisha KM, Martin B, et al. PIK3CA-associated developmental disorders exhibit distinct classes of mutations with variable expression and tissue distribution. *JCI Insight.* 2016;1(9).
90. Peterman CM, Vadeboncoeur S, Mulliken JB, Fishman SJ, Liang MG. Wilms tumor screening in diffuse capillary malformation with overgrowth and macrocephaly-capillary malformation: A retrospective study. *J Am Acad Dermatol.* 2017;77(5):874-8.
91. Katugampola R, Moss C, Mills C. Macrocephaly-cutis marmorata telangiectatica congenita: A case report and review of salient features. *J Am Acad Dermatol.* 2008;58(4):697-702.
92. Lopez-Gutierrez JC, Lapunzina P. Capillary malformation of the lower lip, lymphatic malformation of the face and neck, asymmetry and partial/generalized overgrowth (CLAPO): report of six cases of a new syndrome/association. *Am J Med Genet A.* 2008;146A(20):2583-8.
93. Rodriguez-Laguna L, Ibanez K, Gordo G, Garcia-Minaur S, Santos-Simarro F, Agra N, et al. CLAPO syndrome: identification of somatic activating PIK3CA mutations and delineation of the natural history and phenotype. *Genet Med.* 2018.
94. Sapp JC, Turner JT, van de Kamp JM, van Dijk FS, Lowry RB, Biesecker LG. Newly delineated syndrome of congenital lipomatous overgrowth, vascular malformations, and epidermal nevi (CLOVE syndrome) in seven patients. *Am J Med Genet A.* 2007;143A(24):2944-58.
95. Martinez-Lopez A, Blasco-Morente G, Perez-Lopez I, Herrera-Garcia JD, Luque-Valenzuela M, Sanchez-Cano D, et al. CLOVES syndrome: review of a PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). *Clin Genet.* 2017;91(1):14-21.
96. Minami M, Konishi T, Takase H, Jiang Z, Arai T, Makino T. Effect of Shin'iseihaito (Xinyiqingfeitang) on Acute Streptococcus pneumoniae Murine Sinusitis via Macrophage Activation. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017;2017:4293291.
97. Kotwal PP, Farooque M. Macrodactyly. *J Bone Joint Surg Br.* 1998;80(4):651-3.
98. Fengdong Z, Rongrong Z, Peihua S, Shunwu F. Macrodactyly of the great toe for thirty-five years. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2009;62(11):e520-2.
99. Tripolszki K, Knox R, Parker V, Semple R, Farkas K, Sulak A, et al. Somatic mosaicism of the PIK3CA gene identified in a Hungarian girl with macrodactyly and syndactyly. *Eur J Med Genet.* 2016;59(4):223-6.
100. Hop MJ, van der Biezen JJ. Ray reduction of the foot in the treatment of macrodactyly and review of the literature. *J Foot Ankle Surg.* 2011;50(4):434-8.
101. Cerrato F, Eberlin KR, Waters P, Upton J, Taghinia A, Labow BI. Presentation and treatment of macrodactyly in children. *J Hand Surg Am.* 2013;38(11):2112-23.

102. Humphry SG. Macrodactyly, and some other Forms of Congenital Overgrowth, and their Relation to Tumours. *Med Chir Trans.* 1891;74:165-80.
103. Loconte DC, Grossi V, Bozzao C, Forte G, Bagnulo R, Stella A, et al. Molecular and Functional Characterization of Three Different Postzygotic Mutations in PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum (PROS) Patients: Effects on PI3K/AKT/mTOR Signaling and Sensitivity to PIK3 Inhibitors. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123092.
104. Yang X, Jiang Y, Han G, Shi Y, Zhou S, Ni F, et al. Altered Adipose-Derived Stem Cell Characteristics in Macrodactyly. *Sci Rep.* 2017;7(1):11090.
105. Lee MS, Liang MG, Mulliken JB. Diffuse capillary malformation with overgrowth: a clinical subtype of vascular anomalies with hypertrophy. *J Am Acad Dermatol.* 2013;69(4):589-94.
106. Brion M, Salas A, Gonzalez-Neira A, Lareu MV, Carracedo A. Insights into Iberian population origins through the construction of highly informative Y-chromosome haplotypes using biallelic markers, STRs, and the MSY1 minisatellite. *Am J Phys Anthropol.* 2003;122(2):147-61.
107. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-20.
108. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012;9(4):357-9.
109. Pirooznia M, Kramer M, Parla J, Goes FS, Potash JB, McCombie WR, et al. Validation and assessment of variant calling pipelines for next-generation sequencing. *Hum Genomics.* 2014;8:14.
110. Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics.* 2011;27(21):2987-93.
111. Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet.* 2014;46(3):310-5.
112. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4(7):1073-81.
113. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248-9.
114. Reva B, Antipin Y, Sander C. Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(17):e118.
115. Shihab HA, Gough J, Cooper DN, Stenson PD, Barker GL, Edwards KJ, et al. Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Hum Mutat.* 2013;34(1):57-65.
116. Carter H, Douville C, Stenson PD, Cooper DN, Karchin R. Identifying Mendelian disease genes with the variant effect scoring tool. *BMC Genomics.* 2013;14 Suppl 3:S3.
117. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014;11(4):361-2.
118. Baker CL, Vaughn CP, Samowitz WS. A PIK3CA pyrosequencing-based assay that excludes pseudogene interference. *J Mol Diagn.* 2012;14(1):56-60.
119. Baek ST, Copeland B, Yun EJ, Kwon SK, Guemez-Gamboa A, Schaffer AE, et al. An AKT3-FOXP1-reelin network underlies defective migration in human focal malformations of cortical development. *Nat Med.* 2015;21(12):1445-54.
120. Schutz-Geschwender A ZY, Holt T, McDermitt D, and Olive DM. Quantitative, Two-Color Western Blot Detection With Infrared Fluorescence. *LI-COR Biosciences.* 2004.
121. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24.

122. Leiter SM, Parker VER, Welters A, Knox R, Rocha N, Clark G, et al. Hypoinsulinaemic, hypoketotic hypoglycaemia due to mosaic genetic activation of PI3-kinase. *Eur J Endocrinol.* 2017;177(2):175-86.
123. Huchtagowder V, Shenoy A, Corliss M, Vigh-Conrad KA, Storer C, Grange DK, et al. Utility of clinical high-depth next generation sequencing for somatic variant detection in the PIK3CA-related overgrowth spectrum. *Clin Genet.* 2017;91(1):79-85.
124. Dogruluk T, Tsang YH, Espitia M, Chen F, Chen T, Chong Z, et al. Identification of Variant-Specific Functions of PIK3CA by Rapid Phenotyping of Rare Mutations. *Cancer Res.* 2015;75(24):5341-54.
125. Orloff MS, He X, Peterson C, Chen F, Chen JL, Mester JL, et al. Germline PIK3CA and AKT1 mutations in Cowden and Cowden-like syndromes. *Am J Hum Genet.* 2013;92(1):76-80.
126. Burke JE, Perisic O, Masson GR, Vadas O, Williams RL. Oncogenic mutations mimic and enhance dynamic events in the natural activation of phosphoinositide 3-kinase p110alpha (PIK3CA). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(38):15259-64.
127. Rudd ML, Price JC, Fogoros S, Godwin AK, Sgroi DC, Merino MJ, et al. A unique spectrum of somatic PIK3CA (p110alpha) mutations within primary endometrial carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2011;17(6):1331-40.
128. Ikenoue T, Kanai F, Hikiba Y, Obata T, Tanaka Y, Imamura J, et al. Functional analysis of PIK3CA gene mutations in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 2005;65(11):4562-7.
129. Lauz M, Eckhardt S, Fromm KM, Giese B. The influence of dipole moments on the mechanism of electron transfer through helical peptides. *Phys Chem Chem Phys.* 2012;14(40):13785-8.
130. Wang J, Kuropatwinski K, Hauser J, Rossi MR, Zhou Y, Conway A, et al. Colon carcinoma cells harboring PIK3CA mutations display resistance to growth factor deprivation induced apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(3):1143-50.
131. Mirzaa GM, Campbell CD, Solovieff N, Goold C, Jansen LA, Menon S, et al. Association of MTOR Mutations With Developmental Brain Disorders, Including Megalencephaly, Focal Cortical Dysplasia, and Pigmentary Mosaicism. *JAMA Neurol.* 2016;73(7):836-45.
132. Ghahramani N KS, Ghahremani S, Lee H, Strom S, Deignan J, et al. Activating Mutations in mTOR Cause Human Overgrowth Associated with Macrocephaly, Intellectual Disability, and Distinct Dysmorphic Features. 2016.
133. Baynam G, Overkov A, Davis M, Mina K, Schofield L, Allcock R, et al. A germline MTOR mutation in Aboriginal Australian siblings with intellectual disability, dysmorphism, macrocephaly, and small thoraces. *Am J Med Genet A.* 2015;167(7):1659-67.
134. Moosa S, Bohrer-Rabel H, Altmüller J, Beleggia F, Nurnberg P, Li Y, et al. Smith-Kingsmore syndrome: A third family with the MTOR mutation c.5395G>A p.(Glu1799Lys) and evidence for paternal gonadal mosaicism. *Am J Med Genet A.* 2017;173(1):264-7.
135. Mroske C, Rasmussen K, Shinde DN, Huether R, Powis Z, Lu HM, et al. Germline activating MTOR mutation arising through gonadal mosaicism in two brothers with megalencephaly and neurodevelopmental abnormalities. *BMC Med Genet.* 2015;16:102.
136. Peachell PT, Lichtenstein LM, Schleimer RP. Inhibition by adenosine of histamine and leukotriene release from human basophils. *Biochem Pharmacol.* 1989;38(11):1717-25.
137. Alcantara D, Timms AE, Gripp K, Baker L, Park K, Collins S, et al. Mutations of AKT3 are associated with a wide spectrum of developmental disorders including extreme megalencephaly. *Brain.* 2017;140(10):2610-22.
138. Martinez-Lage JF, Guillen-Navarro E, Almagro MJ, Felipe-Murcia M, Lopez Lopez-Guerrero A, Galarza M. Hydrocephalus and Chiari type 1 malformation in macrocephaly-cutis marmorata telangiectatica congenita: a case-based update. *Childs Nerv Syst.* 2010;26(1):13-8.
139. Arya VB, Flanagan SE, Schober E, Rami-Merhar B, Ellard S, Hussain K. Activating AKT2 mutation: hypoinsulinemic hypoketotic hypoglycemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(2):391-4.

140. McDermott JH, Hickson N, Banerjee I, Murray PG, Ram D, Metcalfe K, et al. Hypoglycaemia represents a clinically significant manifestation of PIK3CA- and CCND2-associated segmental overgrowth. *Clin Genet*. 2017.
141. Eng C. PTEN Hamartoma Tumor Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA)1993.
142. Andersson E, Borg B, de Leeuw R. Characterization of gonadotropin-releasing hormone binding sites in the pituitary of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Gen Comp Endocrinol*. 1989;76(1):41-5.
143. Lapunzina P. Risk of tumorigenesis in overgrowth syndromes: a comprehensive review. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2005;137C(1):53-71.
144. Gripp KW, Baker L, Kandula V, Conard K, Scavina M, Napoli JA, et al. Nephroblastomatosis or Wilms tumor in a fourth patient with a somatic PIK3CA mutation. *Am J Med Genet A*. 2016;170(10):2559-69.
145. Peterman CM, Fevurly RD, Alomari AI, Trenor CC, 3rd, Adams DM, Vadeboncoeur S, et al. Sonographic screening for Wilms tumor in children with CLOVES syndrome. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64(12).
146. Biderman Waberski M, Lindhurst M, Keppler-Noreuil KM, Sapp JC, Baker L, Gripp KW, et al. Urine cell-free DNA is a biomarker for nephroblastomatosis or Wilms tumor in PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). *Genet Med*. 2018.
147. Michel ME, Konczyk DJ, Yeung KS, Murillo R, Vivero MP, Hall AM, et al. Causal somatic mutations in urine DNA from persons with the CLOVES subgroup of the PIK3CA-related overgrowth spectrum. *Clin Genet*. 2017.
148. Baba Y, Maeda T, Suzuki A, Takada S, Fujii M, Kato Y. Deguelin Potentiates Apoptotic Activity of an EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor (AG1478) in PIK3CA-Mutated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2).
149. Di Donato N, Rump A, Mirzaa GM, Alcantara D, Oliver A, Schrock E, et al. Identification and Characterization of a Novel Constitutional PIK3CA Mutation in a Child Lacking the Typical Segmental Overgrowth of "PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum". *Hum Mutat*. 2016;37(3):242-5.
150. Lui VW, Hedberg ML, Li H, Vangara BS, Pendleton K, Zeng Y, et al. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov*. 2013;3(7):761-9.
151. Nakamura K, Kato M, Tohyama J, Shiohama T, Hayasaka K, Nishiyama K, et al. AKT3 and PIK3R2 mutations in two patients with megalencephaly-related syndromes: MCAP and MPPH. *Clin Genet*. 2014;85(4):396-8.
152. Nellist M, Schot R, Hoogeveen-Westerveld M, Neuteboom RF, van der Louw EJ, Lequin MH, et al. Germline activating AKT3 mutation associated with megalencephaly, polymicrogyria, epilepsy and hypoglycemia. *Mol Genet Metab*. 2015;114(3):467-73.
153. Harada A, Miya F, Utsunomiya H, Kato M, Yamanaka T, Tsunoda T, et al. Sudden death in a case of megalencephaly capillary malformation associated with a de novo mutation in AKT3. *Childs Nerv Syst*. 2015;31(3):465-71.
154. Jamuar SS, Lam AT, Kircher M, D'Gama AM, Wang J, Barry BJ, et al. Somatic mutations in cerebral cortical malformations. *N Engl J Med*. 2014;371(8):733-43.
155. Negishi Y, Miya F, Hattori A, Johmura Y, Nakagawa M, Ando N, et al. A combination of genetic and biochemical analyses for the diagnosis of PI3K-AKT-mTOR pathway-associated megalencephaly. *BMC Med Genet*. 2017;18(1):4.
156. Grabiner BC, Nardi V, Birsoy K, Possemato R, Shen K, Sinha S, et al. A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity. *Cancer Discov*. 2014;4(5):554-63.
157. Biesecker LG. Mosaic disorders and the Taxonomy of Human Disease. *Genet Med*. 2017.

158. Miller MS, Maheshwari S, McRobb FM, Kinzler KW, Amzel LM, Vogelstein B, et al. Identification of allosteric binding sites for PI3Kalpha oncogenic mutant specific inhibitor design. *Bioorg Med Chem*. 2017;25(4):1481-6.
159. Lindhurst MJ, Yourick MR, Yu Y, Savage RE, Ferrari D, Biesecker LG. Repression of AKT signaling by ARQ 092 in cells and tissues from patients with Proteus syndrome. *Sci Rep*. 2015;5:17162.
160. Keppler-Noreuil KM, SJ, Wang A, Taneja A, Duckworth C, Chen K, Lindhurst M, Biesecker LG. Nonrandomized Open Label Pilot Study of Sirolimus Therapy for PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum (PROS): Preliminary Findings ACMG2017.

ANEXO I: INFORMACIÓN ADICIONAL

Tabla Anexa 1: Datos de los pacientes incluidos en la cohorte PROS.

Paciente	Diag. Clínico presuntivo	Edad	Sexo	Datos clínicos	Sangre	Saliva	Tejido	Padres	Estudio molecular	Diag. Molecular	Diag. Clínico Final
TSR001	MCAP	24,1	H	+	+	-	-	-	+	-	MCAP
TSR002	MCAP	¿	H	-	+	-	-	-	+	-	MCAP
TSR003	MCAP	14,4	H	+	-	-	-	+	-	-	MCAP
TSR004	MCAP	13,7	M	-	-	-	-	-	-	-	MCAP
TSR005	MCAP	¿	H	+	-	-	-	Madre	-	-	MCAP
TSR006	MCAP	12,7	H	+	+	+	+	+	+	-	MCAP
TSR007	MCAP	15,3	H	+	+	+	+	+	+	+	MCAP
TSR008	MCAP	16,6	H	+	+	-	-	+	+	-	MCAP
TSR009	MCAP	11,8	H	+	+	+	+	+	+	+	MCAP
TSR012	MCAP	10,9	H	+	+	-	-	-	-	-	MCAP
TSR013	CLOVES	18,5	M	+	+	+	+	+	+	+	CLOVES
TSR014	MCAP	10,7	M	+	+	+	+	+	+	+	MCAP
TSR015	MCAP	10,4	M	+	+	+	-	+	+	+	SKS
TSR016	MCAP	11,6	H	+	+	+	-	+	+	+	SKS
TSR017	MCAP	9,9	H	+	+	-	-	-	+	-	MCAP
TSR018	MCAP	12,3	H	+	+	+	-	+	+	+	MCAP
TSR019	MCAP	10,2	H	+	+	+	+	+	+	+	MCAP
TSR020	MCAP	11,2	H	+	+	-	-	+	+	+	MCAP
TSR021	CLOVES	10,1	H	+	+	-	-	+	+	+	PHTS
TSR022	CLOVES	10,5	M	+	+	+	+	Padre	+	+	CLOVES
TSR023	MCAP	9,2	H	+	+	+	+	+	+	+	SKS
TSR024	MCAP	17,3	H	+	+	-	-	+	+	-	MCAP
TSR025	PROS	7,9	M	+	+	-	-	-	+	-	PROS
TSR026	MCAP	6,0	H	+	+	+	+	+	+	+	MCAP/CLAPO
TSR027	MCAP	7,1	H	+	+	+	+	+	+	-	MCAP
TSR028	MCAP	5,5	M	+	+	+	-	+	+	+	MCAP
TSR029	MCAP	6,2	H	+	+	+	+	+	+	+	MCAP/CLAPO
TSR030	MCAP	4,6	H	+	+	+	+	+	+	+	MCAP/CLAPO
TSR031	MCAP	4,1	H	+	+	-	+	+	+	+	MCAP
TSR032	MCAP	11,8	H	+	+	-	+	+	+	-	MCAP
TSR033	CLOVES	42,6	M	+	+	+	+	-	+	+	CLOVES
TSR034	CLOVES	7,9	H	+	+	-	-	Padre	+	-	CLOVES
TSR035	CLOVES	5,3	H	+	+	+	+	+	+	+	CLOVES
TSR036	CLOVES	5,1	H	+	+	+	+	+	+	+	CLOVES
TSR037	CLOVES	12,7	H	+	+	-	+	+	+	+	CLOVES/MCAP
TSR038	CLOVES	8,1	H	+	+	-	-	Madre	+	-	CLOVES
TSR039	CLOVES	19,3	M	+	+	+	+	+	+	+	CLOVES
TSR040	MCAP	¿	H	-	+	-	-	-	+	-	MCAP
TSR041	MCAP	8,9	H	+	+	+	+	+	+	+	MCAP
TSR042	CLOVES	13,5	H	+	+	+	+	+	+	+	CLOVES
TSR043	CLOVES	12,6	H	+	+	+	+	+	+	+	CLOVES

TSR044	CLOVES	6,8	M	+	-	-	-	-	-	-	CLOVES
TSR045	CLOVES	6,6	M	+	+	+	+	+	+	-	CLOVES
TSR046	CLOVES	8,1	H	+	-	-	-	-	-	-	CLOVES
TSR047	CLOVES	6,4	H	+	+	+	-	+	+	-	CLOVES
TSR048	CLOVES	6,9	M	+	-	-	-	-	-	-	CLOVES
TSR049	MCAP	4,9	M	+	-	-	-	-	-	-	MCAP
TSR050	CLOVES	19,3	H	+	+	-	-	-	+	-	CLOVES
TSR051	CLOVES	16,6	M	-	+	-	+	-	+	+	CLOVES
TSR052	MCAP	¿	H	-	+	+	-	+	+	-	MCAP
TSR053	CLOVES	4,3	M	+	-	+	+	+	+	+	CLOVES/M CAP
TSR054	CLOVES	6,7	M	+	+	+	-	+	+	-	CLOVES
TSR055	MCAP	8,8	H	+	+	+	+	-	+	-	MCAP
TSR056	MCAP	14,6	H	+	+	+	+	+	+	+	MCAP
TSR058	MCAP	9,2	H	+	+	-	+	-	+	+	MCAP
TSR059	MCAP	4,4	M	-	+	-	-	+	+	+	MCAP
TSR060	CLOVES	13,8	H	+	+	-	+	-	+	-	CLOVES
TSR061	DCMO	11,5	M	-	+	-	-	+	+	-	DCMO
TSR062	CLOVES	3,6	M	+	+	+	+	-	+	+	CLOVES
TSR063	CLOVES	10,7	H	+	+	-	+	+	+	+	CLOVES
TSR064	Macrodac tilia	10,2	H	+	+	-	+	-	+	+	Macrodac tilia
TSR065	Macrodac tilia	5,9	H	+	-	-	-	-	-	-	Macrodac tilia
TSR066	Macrodac tilia	6,1	M	+	+	-	+	-	+	-	Macrodac tilia
TSR067	DCMO	3,6	M	-	+	+	+	+	+	-	DCMO
TSR068	Macrodac tilia	8,3	H	+	+	-	-	+	+	-	Macrodac tilia
TSR069	DCMO	¿	H	-	+	+	+	+	+	-	DCMO
TSR070	Macrodac tilia	9,6	M	+	+	-	+	-	+	+	Macrodac tilia
TSR071	DCMO	2,1	H	+	+	-	+	-	+	+	CLOVES
TSR072	PROS	6,6	H	+	+	-	+	+	+	-	PROS
TSR073	PROS	14,1	H	-	+	-	+	-	+	+	PROS
TSR074	Hemihipe rtrofia	13,3	H	+	+	-	-	Padre	+	-	Hemihipert rofia
TSR075	PROS	3,8	M	+	+	-	-	+	+	-	PROS
TSR076	DCMO	3,1	H	+	+	+	+	-	+	+	DCMO
TSR077	PROS	3,9	H	-	+	+	+	-	+	+	PROS
TSR078	PROS	7,1	H	-	+	+	+	-	+	+	PROS
TSR079	PROS	5,2	M	-	+	+	+	+	+	+	PROS
TSR080	PROS	2,0	M	+	+	+	+	-	+	-*	PROS
TSR081	Macrodac tilia	13,4	H	+	+	-	-	+	+	-	Macrodac tilia
TSR082	PROS	¿	M	-	+	-	+	-	+	-	PROS
TSR083	PROS	12,4	M	+	-	-	-	-	-	-	PROS
TSR084	CLOVES	23,7	H	+	+	-	-	Padre	+	-	CLOVES
TSR085	PROS	2,4	M	-	-	+	-	-	+	-	PROS
TSR086	PROS	5,5	M	-	-	+	-	-	+	-	PROS
TSR087	MCAP	4,1	H	+	+	+	-	-	+	+	MCAP
TSR088	MCAP	10,5	M	+	+	+	+	+	+	+	MCAP

TSR089	PROS	7,5	M	-	+	+	+	-	+	+	PROS
TSR090	Macroductilia	2,1	H	-	-	-	+	-	+	+	Macroductilia
TSR091	PROS	¿	M	+	-	-	-	-	+	-	PROS
TSR092	Macroductilia	6,4	H	+	+	-	+	-	+	+	Macroductilia
TSR093	PROS	6,3	H		+	-	-	-	+	-	PROS
TSR094	MCAP	2,6	M	-	-	+	-	-	+	+	MCAP
TSR096	PROS	30,2	M	-	+	-	+	-	+	-	PROS
TSR097	PROS	¿	M	-	+	-	-	Madre	+	-	PROS
TSR098	PROS	1,9	H	-	+	-	-	+	+	-	PROS
TSR100	PROS	8,8	H	-	-	-	+	-	+	-	PROS
OGS771	Macrocefalia, DI, autismo	14,0	H	+	+	-	-	-	+	+	SKS

En la tabla se indica la identificación correspondiente a cada paciente, el diagnóstico presuntivo inicial al entrar a formar parte del proyecto TSR (Todos Somos Raros), la edad, el género, el tipo de muestra del que se disponía (sangre, saliva, tejido afecto, y sangre de los padres), si se pudo realizar el estudio molecular, si tuvieron diagnóstico molecular positivo, y el diagnóstico final. Abreviaturas: DI: Discapacidad Intelectual; H: Hombre, M: Mujer; +: Sí; - No; CLOVES: Síndrome CLOVES; DCMO: Malformaciones capilares difusas con sobrecrecimiento; MCAP: Macrocefalia-Malformación Capilar; PROS: Espectro de Sobrecrecimientos asociados a *PIK3CA*; PHTS: Trastornos relacionados con *PTEN*; SKS: Síndrome de Smith-Kingsmore.

Tabla Anexa 2: Datos correspondientes al tipo de panel de genes de NGS utilizado en cada paciente y tipo de muestra.

Paciente	Diagnóstico final	Tipo de muestra	Panel de NGS utilizado	Variante causal identificada con NGS	Detectada Protocolo Mosaicos	Detectada Protocolo Constitutivas
TSR001	MCAP	Sangre	Mosaicos P3	-		
TSR002	MCAP	Sangre	Mosaicos P3	-		
TSR006	MCAP	Sangre Saliva Tejido	Mosaicos P1, NIH Mosaicos P1, NIH Mosaicos P1, MALVA P2, NIH	- - -		
TSR007	MCAP	Sangre Saliva Tejido	Mosaicos P3 No Hecho No Hecho	+	+	-
TSR008	MCAP	Sangre	Mosaicos P3	-		
TSR009	MCAP	Sangre Saliva	Mosaicos P1 Mosaicos P1	+	+	+
TSR013	CLOVES	Sangre Saliva Tejido	Mosaicos P1 Mosaicos P1 No Hecho	- -		
TSR014	MCAP	Sangre Saliva Tejido	Mosaicos P1 Mosaicos P1 Mosaicos P1	- + +	+	- +
TSR015	SKS	Sangre	Mosaicos P3	+	+	+
TSR016	SKS	Sangre	Mosaicos P3	+	+	+
TSR017	MCAP	Sangre	Mosaicos P3	-	-	-
TSR018	MCAP	Sangre Saliva	Mosaicos P3 Mosaicos P3	+	-	-
TSR019	MCAP	Sangre Saliva Tejido HV1 HV2	Mosaicos P1 No hecho Mosaicos P1 Mosaicos P1 Mosaicos P1	- + + (IGV) +	+	- - -
TSR020	MCAP	Sangre	Mosaicos P3	+	+	-
TSR021	PHTS	Sangre	Mosaicos P1	+	+	+
TSR022	CLOVES	Sangre Saliva Tejido	Mosaicos P1 Mosaicos P1 Mosaicos P1	- - +	+	-
TSR023	SKS	Sangre Saliva Piel hiperpig. Piel hipopig.	Mosaicos P1 Mosaicos P1 No hecho Mosaicos P1	+	-	-
TSR024	MCAP	Sangre	Mosaicos P5, MALVA P3	-		
TSR025	PROS	Sangre	Mosaicos P3	-		
TSR026	MCAP/CLAPO	Sangre Saliva Tejido	Mosaicos P1 Mosaicos P1 Mosaicos P1	+	+	-
TSR027	MCAP	Sangre Saliva Tejido	Mosaicos P1, NIH Mosaicos P1, NIH MALVA P2, NIH	- - -		
TSR028	MCAP	Sangre Saliva	Mosaicos P3 Mosaicos P3	+	+	-
TSR029	MCAP/CLAPO	Sangre Saliva Tumor	Mosaicos P1 Mosaicos P1 Mosaicos P3	+	+	-

		MV en riñón	Mosaicos P3	+	+	+
		Piel sana	Mosaicos P3	+	+	+
TSR030	MCAP/CLAPO	Sangre	Mosaicos P3	-		
		Saliva	Mosaicos P3	+	+	+
		Tejido	Mosaicos P3	+	+	+
TSR031	MCAP	Sangre	Mosaicos P1	+	+	+
		Tejido	Mosaicos P1	+	+	+
TSR032	MCAP	Sangre	Mosaicos P1, NIH	-		
		Tejido	Mosaicos P1, MALVA P2, NIH	-		
TSR033	CLOVES	Sangre	Mosaicos P2, NIH	-		
		Saliva	Mosaicos P2	-		
		FFPE	NIH	+		
TSR034	CLOVES	Sangre	Mosaicos P3	-		
TSR035	CLOVES	Sangre	Mosaicos P2	+ (IGV)	-	-
		Saliva	Mosaicos P2	-		
		Tejido	Mosaicos P2	+	+	+
		Tejido	Mosaicos P2	+	+	+
TSR036	CLOVES	Sangre	Mosaicos P1	-		
		Saliva	Mosaicos P1	-		
		Tejido	Mosaicos P1	+	+	+
TSR037	CLOVES/MCAP	Sangre	Mosaicos P3, MALVA P2, NIH	+	+	-
		FFPE	NIH	+		
TSR038	CLOVES	Sangre	Mosaicos P3	-		
TSR039	CLOVES	Sangre	Mosaicos P2	-		
		Saliva	Mosaicos P2	-		
		Tejido	Mosaicos P2	+	+	-
TSR040	MCAP	Sangre	Mosaicos P3, MALVA P2	-		
TSR041	MCAP	Sangre	Mosaicos P2, NIH	+ (IGV)	-	-
		Saliva	Mosaicos P2, NIH	+	+	+
		Tejido	Mosaicos P2, NIH	+	+	+
TSR042	CLOVES	Sangre	Mosaicos P2	-	-	-
		Saliva	Mosaicos P2	-	-	-
		FFPE	MALVA P1	+	+	-
TSR043	CLOVES	Sangre	Mosaicos P3	-		
		Saliva	Mosaicos P3	-		
		Tejido	Mosaicos P3	+	+	-
TSR045	CLOVES	Sangre	Mosaicos P2, NIH	-		
		Saliva	Mosaicos P2	-		
		Tejido	Mosaicos P2, MALVA P2, NIH	-		
TSR047	CLOVES	Sangre	Mosaicos P3, NIH	-		
		Saliva	Mosaicos P3	-		
TSR050	CLOVES	Sangre	Mosaicos P2	-		
TSR051	CLOVES	Sangre	Mosaicos P2	-		
		Tejido	Mosaicos P2	+	+	-
		Tejido	Mosaicos P2	-		
TSR052	MCAP	Sangre	Mosaicos P2, NIH	-		
		Saliva	Mosaicos P2, MALVA P2, NIH	-		
TSR053	CLOVES/MCAP	Saliva	Mosaicos P2	+	+	-
		Tejido	Mosaicos P2	+	+	-
TSR054	CLOVES	Sangre	Mosaicos P3	-		
		Saliva	Mosaicos P3	-		
TSR055	MCAP	Sangre	Mosaicos P2, NIH	-		
		Saliva	Mosaicos P2, NIH	-		
		Tejido	Mosaicos P2, MALVA P3, NIH	-		
TSR056	MCAP	Sangre	Mosaicos P2	-		

		Saliva	Mosaicos P2	No analizable		
		Tejido	Mosaicos P2	+	+	-
TSR058	MCAP	Sangre	Mosaicos P3, MALVA P2	-		
		Tejido	MALVA P2	+	+	-
TSR059	MCAP	Sangre	Mosaicos P3	+	+	-
TSR060	CLOVES	Sangre	Mosaicos P2, NIH	-		
		Tejido	Mosaicos P2, MALVA P2, NIH	-		
TSR061	DCMO	Sangre	Mosaicos P3, MALVA P2, NIH	-		
TSR062	CLOVES	Sangre	Mosaicos P3	-		
		Saliva	Mosaicos P3	-		
		Tejido	Mosaicos P3	+	+	-
TSR063	CLOVES	Sangre	Mosaicos P2	-		
		Tejido	Mosaicos P2	+	+	-
TSR064	Macroductilia	Sangre	Mosaicos P3	-		
		FFPE	NIH	+		
TSR066	Macroductilia	Sangre	Mosaicos P2, NIH	-		
		Tejido	Mosaicos P2, MALVA P2, NIH	-		
TSR067	DCMO	Sangre	Mosaicos P2, NIH	-		
		Saliva	Mosaicos P2, NIH	-		
		Tejido	Mosaicos P2, MALVA P3, NIH	-		
TSR068	Macroductilia	Sangre	Mosaicos P3	-		
TSR069	DCMO	Sangre	Mosaicos P2, NIH	-		
		Saliva	Mosaicos P2, NIH	-		
		Tejido	Mosaicos P2, MALVA P3, NIH	-		
TSR070	Macroductilia	Sangre	Mosaicos P3	-		
		Tejido	No hecho			
TSR071	CLOVES	Sangre	Mosaicos P3	-		
		Tejido	MALVA P3	+	+	+
TSR072	PROS	Sangre	Mosaicos P3, NIH	-		
		Tejido	MALVA P3, NIH	-		
TSR073	PROS	Sangre	Mosaicos P4, NIH	-		
		Tejido	Mosaicos P4, MALVA P3	-		
		Tejido	Mosaicos P4	-		
		sano				
		Cels TS	NIH, MALVA P3	-		
		CelsTA	NIH	+		
TSR074	Hemihipertrofia	Sangre	MALVA P2	-		
TSR075	PROS	Sangre	MALVA P3	-		
TSR076	DCMO	Sangre	MALVA P2	-		
		Saliva	MALVA P2	+	+	-
		Tejido	MALVA P3	+	+	-
TSR077	PROS	Sangre	MALVA P2, NIH	-		
		Saliva	MALVA P2, NIH	+ (IGV)		
		Tejido	MALVA P3, NIH	+	+	-
TSR078	PROS	Sangre	MALVA P2, NIH	-		
		Saliva	MALVA P2, NIH	+	+	-
		Tejido	MALVA P3, NIH	+	+	-
TSR079	PROS	Sangre	MALVA P3	-		
		Saliva	MALVA P3	No analizable		
		Tejido	MALVA P2	+	+	-
TSR080	PROS	Sangre	MALVA P3, NIH	-		
		Saliva	MALVA P2	-		
		Tejido	MALVA P3, NIH	-		
TSR081	Macroductilia	Sangre	MALVA P3	-		
TSR082	PROS	Sangre	MALVA P3	-		

		Tejido	MALVA P3	-		
TSR084	CLOVES	Sangre	MALVA P3	-		
TSR085	PROS	Saliva	MALVA P3	-		
TSR086	PROS	Saliva	MALVA P3	-		
TSR087	MCAP	Sangre	MALVA P3	+	+	-
		Mucosa bucal	MALVA P3	No analizable		
TSR088	MCAP	Sangre	MALVA P3	+	+	-
		Mucosa bucal	MALVA P3	+	+	+
		Piel	No hecho			
TSR089	PROS	Sangre	MALVA P3	-		
		Saliva	MALVA P3	-		
		Tejido afecto	MALVA P3	+	+	-
TSR090	Macroductilia	Tejido afecto	MALVA P3	+	+	+
TSR092	Macroductilia	Sangre	MALVA P4	-		
		Piel	MALVA P4	+	+	+
TSR093	PROS	Sangre	MALVA P4	-		
TSR094	MCAP	Saliva	MALVA P4	+	+	-
TSR096	PROS	Sangre	MALVA P5	-		
		Tejido	MALVA P5	-		
TSR097	PROS	Sangre	MALVA P5	-		
TSR098	PROS	Sangre	MALVA P5	-		
TSR100	PROS	MV pie	MALVA P5	-		
		MV escroto	MALVA P5	-		
OGS771	SKS	Sangre	Mosaicos P4	+	+	+

En los casos en los que se identificó una variante causal en un paciente, se indica con el tipo de protocolo bioinformático que se detectó: mosaicos y/o constitutivo. Cuando aparece + (IGV) significa que la variante pudo visualizarse en el archivo bam con el programa IGV, pero no aparecía anotada con el protocolo bioinformático. Abreviaturas: FFPE: Tejido en parafina; Hiperpig.: hiperpigmentada; Hipopig.: hipopigmentada; HV: Hemangioma Venoso; IGV: *Integrative Genome Viewer*; MV: Malformación Vascular; NIH: *National Institutes of Health*; P: Pool. +: Sí; -: No.

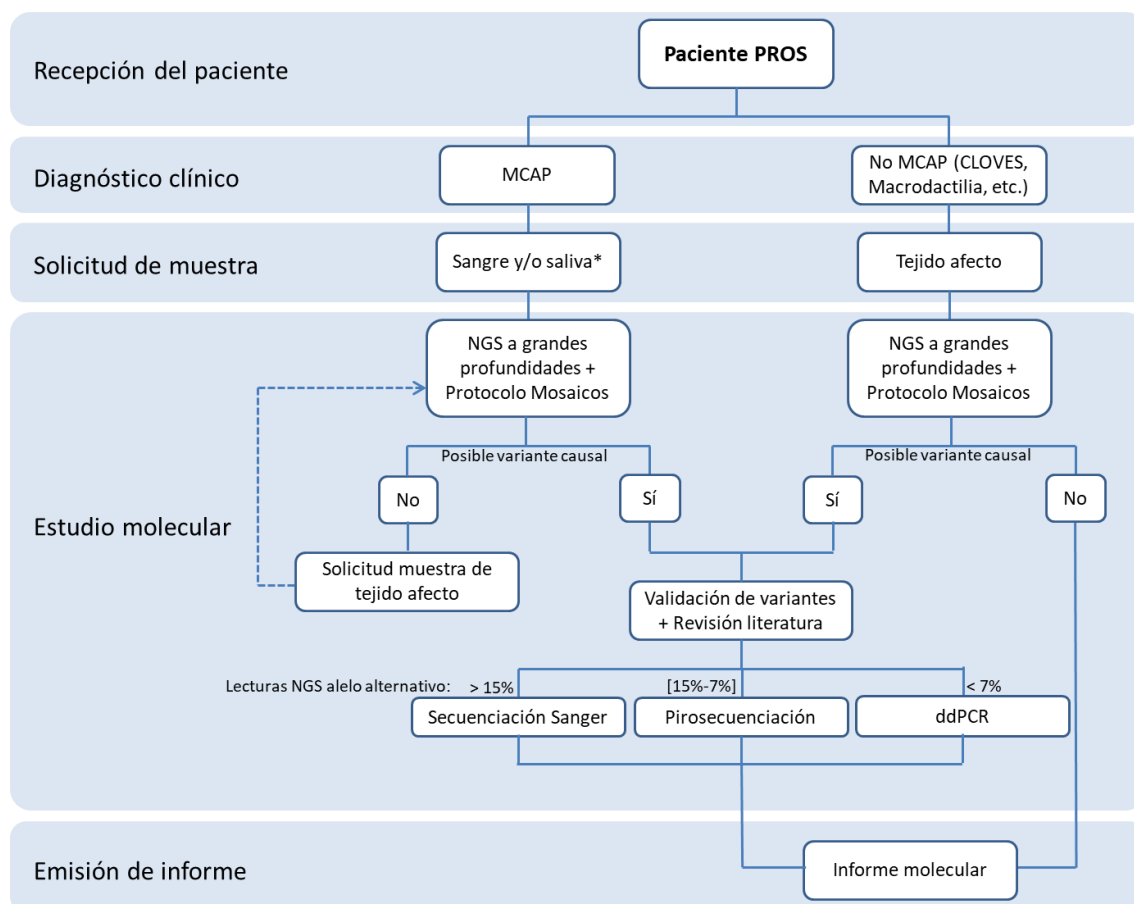


Figura Anexa 1: Protocolo diagnóstico propuesto para pacientes con PROS (Espectro de Sobrecrecimientos asociados a *PIK3CA*). El paciente es recibido en el INGEMM u otro hospital, pasa por la consulta de Genética Clínica que establece un diagnóstico clínico previo, y solicita el tipo de muestra necesaria según el diagnóstico establecido. Una vez recibidas las muestras y extraído el ADN, se procede a realizar el estudio molecular, para finalmente emitir un informe. El panel de genes utilizado para la realización de NGS debe incluir *PIK3CA* y además los genes incluidos en la ruta PI3K/AKT/mTOR. *Si se trata de un paciente que haya sido intervenido quirúrgicamente con anterioridad y se dispone de muestras de tejido embebido en parafina, se solicitarán también dichas muestras.

ANEXO II: CUESTIONARIO CLÍNICO

Cuestionario Síndromes de Sobrecrecimiento Asociados a *PIK3CA* (*PIK3CA*-Related Overgrowth Spectrum -PROS-)

DATOS DEL PACIENTE

Nombre y Apellidos:

Fecha de nacimiento:

Sexo: ☐ Mujer ☐ Hombre

Diagnóstico presuntivo:

Teléfono de contacto:

Correo electrónico:

Dirección:

Centro de procedencia:

Médico:

Teléfono:

Correo electrónico:

Nombre y Apellidos Madre:

F. nacimiento:

Lugar:

Nombre y Apellidos Padre:

F. nacimiento:

Lugar:

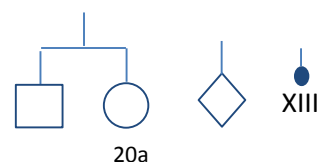
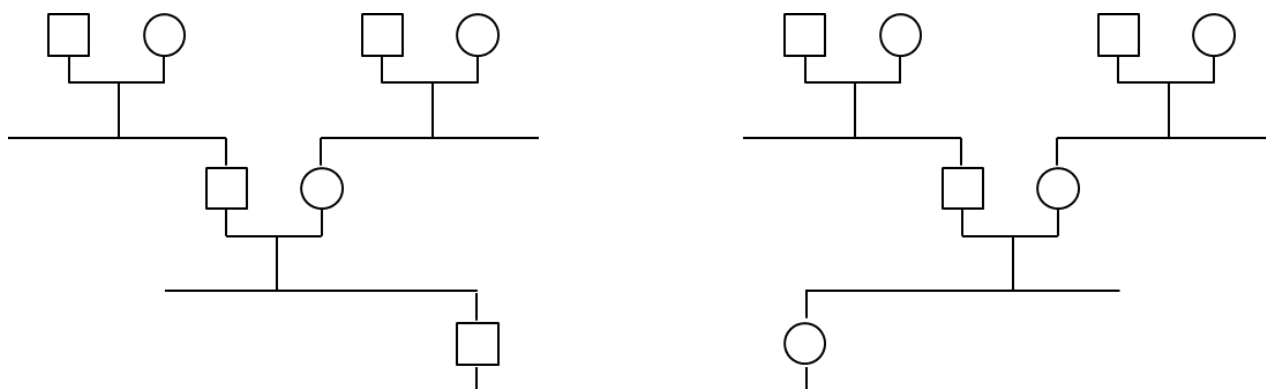
Consanguinidad: ☐ Sí ☐ NoHermanos: ☐ Sí () ☐ NoAbortos espontáneos: ☐ Sí ☐ No

Antecedentes de cáncer:

Enf. Familiares:

Otros datos de interés:

PEDIGRÍ: (dibujar)



DATOS REGISTRO Y MUESTRAS:

Nº Historia clínica:	Cariotipo/Registro INGEMM:		
Nº TSR:	Otros:		
ADN Sangre:	ADN Saliva:	ADN tejido:	ADN Células:
ADN Madre:	ADN Padre:	Otros:	
Fotos: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Consentimiento informado: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No		
Otros datos:			

DATOS AL NACIMIENTO:

Edad gestacional (semanas):	Peso (gramos):
Talla (cm):	Perímetro cefálico (cm):
Edad de la Madre:	Edad del Padre:
Otros datos de interés:	

ANTECEDENTES PERSONALES:

Embarazo:	Monitoreo:
Ecografías:	Aumento de peso:
Movimientos fetales:	
Parto:	
Perinatológico:	

ANTECEDENTES MADURATIVOS:

Sonrisa social:	Lenguaje:
Sedestación:	Sostén cefálico:
Gateo:	Control de esfínteres:
Marcha con ayuda:	Marcha sin ayuda:
Escolaridad:	
Otros:	

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS ASOCIADAS A PROS

Cabeza y Cuello			Frecuente en:	Anotaciones:
<input type="checkbox"/>	HP:0000256	Macrocefalia	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0004481	Macrocefalia progresiva	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0000324	Asimetría facial	MCAP, CLOVES	
<input type="checkbox"/>	HP:0001999	Dismorfismo facial	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0000316	Hipertelorismo	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0000648	Atrofia óptica	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0000286	Epicanto	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0000568	Microftalmia	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0000490	Ojos hundidos	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0009748	Lóbulo de la oreja grande	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0000337	Frente amplia	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0000348	Frente alta	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0002007	Frente prominente	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0000293	Mejillas rellenas, prominentes	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0000494	Hendiduras palpebrales de oblicuidad descendente	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0005280	Puente nasal deprimido	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0000319	Philtrum liso	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0000154	Boca ancha	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0000159	Anomalía del labio	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0000470	Cuello corto	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0007601	Malformación capilar (Hemangioma) de la línea media de la cara: labio / philtrum / glabella.	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0007466	Malformación capilar (Hemangioma) del medio de la frente	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0007452	Malformación capilar (Hemangioma) del tercio medio de la cara	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0000996	Malformación capilar (Hemangioma) facial (otros)	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0004437	Hiperostosis craneal	CLOVES	
Piel				
<input type="checkbox"/>	HP:0000965	Cutis marmorata (Malf. Capilar reticulada/marmorea)	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0100585	Telangiectasia de la piel	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0007509	Manchas de hipo e hiperpigmentación	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0000957	Manchas café con leche	MCAP	
<input type="checkbox"/>	HP:0001053	Manchas hipopigmentadas de la piel	MCAP	

☐ HP:0003764 Nevus CLOVES

Crecimiento

☐ HP:0001548 Crecimiento excesivo (Sobrecrecimiento generalizado) MCAP/CLOVES

☐ HP:0100555 Crecimiento asimétrico (Sobrecrecimiento parcial) MCAP

☐ HP:0001528 Hemihipertrofia CLOVES

☐ HP:0100559 Asimetría de extremidad inferior CLOVES

☐ HP:0001520 Macrosomía MCAP

Sistema cardiovascular

☐ HP:0005306 Malformación capilar (Hemangioma capilar) MCAP

☐ HP:0100026 Malformación arteriovenosa MCAP

☐ HP:0002597 Anomalías vasculares CLOVES

☐ HP:0012721 Malformación venosas CLOVES

☐ HP:0100766 Anomalía vasos linfáticos (Linfedema) CLOVES

☐ HP:0011675 Arritmia MCAP

☐ HP:0001629 Defecto septal ventricular MCAP

☐ HP:0100761 Angiomatosis visceral MCAP

Sistema esquelético

☐ HP:0010442 Polidactilia MCAP

☐ HP:0001161 Polidactilia de la mano MCAP

☐ HP:0001829 Polidactilia de pie MCAP

☐ HP:0001159 Sindactilia MCAP

☐ HP:0006101 Sindactilia de dedo MCAP

☐ HP:0001770 Sindactilia de dedo del pie MCAP

☐ HP:0004099 Macroductilia CLOVES

☐ HP:0001852 Sandal gap CLOVES

☐ HP:0001388 Laxitud articular MCAP

☐ HP:0001382 Hiperlaxitud articular MCAP

☐ HP:0002650 Escoliosis CLOVES

☐ HP:0001176 Manos grandes CLOVES

☐ HP:0001169 Manos anchas CLOVES

☐ HP:0001769 Pies anchos MCAP/CLOVES

Sistema nervioso

☐ HP:0001355 Megalencefalia MCAP

☐ HP:0007206 Hemimegalencefalia MCAP

☐ HP:0002389 Cavum septum pelúcido MCAP

<input type="checkbox"/>	HP:0002308	Malformación de Arnold-Chiari	MCAP
<input type="checkbox"/>	HP:0002269	Anormalidad de la migración neuronal	MCAP
<input type="checkbox"/>	HP:0001250	Epilepsia / Convulsiones	MCAP
<input type="checkbox"/>	HP:0002637	Isquemia cerebral	MCAP
<input type="checkbox"/>	HP:0002119	Ventriculomegalia	MCAP
<input type="checkbox"/>	HP:0100543	Deterioro cognitivo	MCAP
<input type="checkbox"/>	HP:0007360	Aplasia / hipoplasia del cerebelo	MCAP
<input type="checkbox"/>	HP:0001263	Retardo global del desarrollo	MCAP
<input type="checkbox"/>	HP:0002126	Polimicrogria	MCAP
<input type="checkbox"/>	HP:0002858	Meningioma	MCAP
<input type="checkbox"/>	HP:0000238	Hidrocefalia	MCAP
<input type="checkbox"/>	HP:0001249	Discapacidad intelectual	MCAP
<input type="checkbox"/>	HP:0010301	Mielodisrafia (Espina bífida)	CLOVES
<input type="checkbox"/>	HP:0002144	Médula anclada	CLOVES
<input type="checkbox"/>	HP:0002500	Anomalías de la materia blanca	MCAP
<input type="checkbox"/>	HP:0007099	Herniación de amígdalas cerebelosas	MCAP
<input type="checkbox"/>	HP:0002539	Displasia cortical	MCAP
<input type="checkbox"/>		Asimetría cerebral	MCAP
<input type="checkbox"/>		Asimetría del cerebelo	MCAP

Musculatura

<input type="checkbox"/>	HP:0001319	Hipotonía muscular neonatal	MCAP
<input type="checkbox"/>	HP:0001252	Hipotonía muscular	MCAP

Neoplasias

<input type="checkbox"/>	HP:0002667	Nefroblastoma (Tumor de Wilms)	MCAP
<input type="checkbox"/>	HP:0012032	Lipoma	CLOVES
<input type="checkbox"/>	HP:0001909	Leucemia	MCAP

Tejido conectivo y subcutáneo

<input type="checkbox"/>	HP:0003549	Anomalías del tejido conectivo	MCAP
<input type="checkbox"/>	HP:0100790	Hernia	MCAP

Sistema genitourinario

<input type="checkbox"/>	HP:0008678	Hipoplasia / Aplasia renal	CLOVES
--------------------------	------------	----------------------------	--------

Abdomen

<input type="checkbox"/>	HP:0001744	Esplenomegalia	CLOVES
<input type="checkbox"/>	HP:0001537	Hernia umbilical	MCAP

OTRAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS PRESENTES EN EL PACIENTE

OTROS DATOS DE INTERÉS:

EVOLUCIÓN DE LAS MEDIDAS CORPORALES EN EL PACIENTE

[illegible]

	Extremidades Superiores (cm)		Extremidades Inferiores (cm)	
Fecha/Edad	Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda

ESTUDIOS REALIZADOS:





	Tipo	Resultado	Sangre	Saliva	Tejido	Otros
Cromosómico						
Secuenciación Sanger						
Secuenciación masiva						
Pirosecuenciación						
PCR digital						
Arrays						
Microsatélites /MLPA						

INFORME MOLECULAR DE RESULTADOS: ☐ Sí ☐ No

ANEXO III: ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

ORIGINAL ARTICLE

mTOR mutations in Smith-Kingsmore syndrome: Four additional patients and a review

G. Gordo^{1,2,3} | J. Tenorio^{1,2}  | P. Arias^{1,2} | F. Santos-Simarro^{1,4} | S. García-Miñaur^{1,4} | J.C. Moreno^{1,2} | J. Nevado^{1,5} | E. Vallespin^{1,5} | L. Rodriguez-Laguna^{1,3} | R. de Mena^{1,5} | I. Dapia^{1,2} | M. Palomares-Bralo^{1,5}  | Á. del Pozo^{1,6} | K. Ibañez^{1,6} | J.C. Silla^{1,6} | E. Barroso^{1,2} | V.L. Ruiz-Pérez^{1,7} | V. Martinez-Glez^{1,3,4}  | P. Lapunzina^{1,2,4} 

¹Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain

²Molecular Endocrinology Section, Overgrowth Syndromes Laboratory, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), IdiPAZ, Hospital Universitario la Paz, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

³Vascular Malformations Section, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), IdiPAZ, Hospital Universitario la Paz, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

⁴Clinical Genetics Section, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), IdiPAZ, Hospital Universitario la Paz, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

⁵Structural and Functional Genomics Section, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), IdiPAZ, Hospital Universitario la Paz, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

⁶Bioinformatics Section, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), IdiPAZ, Hospital Universitario la Paz, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

⁷IIB, Instituto de Investigación "Alberto Sols", Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

Correspondence

Pablo Lapunzina, MD, PhD, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Universidad Autónoma de Madrid, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Paseo de la Castellana 261-28046, Madrid, Spain. Email: pablo.lapunzina@salud.madrid.org; plapunzina@ciberer.es

Víctor Martínez-Glez, MD, PhD, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Universidad Autónoma de Madrid, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Paseo de la Castellana 261-28046, Madrid, Spain. Email: vmartineglez@salud.madrid.org

Smith-Kingsmore syndrome (SKS) OMIM #616638, also known as MINDS syndrome (ORPHA 457485), is a rare autosomal dominant disorder reported so far in 23 patients. SKS is characterized by intellectual disability, macrocephaly/hemi/megalencephaly, and seizures. It is also associated with a pattern of facial dysmorphism and other non-neurological features. Germline or mosaic mutations of the *mTOR* gene have been detected in all patients. The *mTOR* gene is a key regulator of cell growth, cell proliferation, protein synthesis and synaptic plasticity, and the *mTOR* pathway (PI3K-AKT-*mTOR*) is highly regulated and critical for cell survival and apoptosis. Mutations in different genes in this pathway result in known rare diseases implicated in hemi/megalencephaly with epilepsy, as the tuberous sclerosis complex caused by mutations in *TSC1* and *TSC2*, or the *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS). We here present 4 new cases of SKS, review all clinical and molecular aspects of this disorder, as well as some characteristics of the patients with only brain *mTOR* somatic mutations.

KEYWORDS

constitutive mosaicism, germline mosaicism, gonadal mosaicism, macrocephaly, megalencephaly, MINDS syndrome, *mTOR*, Smith-Kingsmore syndrome, somatic mosaicism

The first authors Gema Gordo and Jair Tenorio contributed equally to this study.

The senior authors Víctor Martínez-Glez and Pablo Lapunzina contributed equally to this study.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2017 The Authors. Clinical Genetics published by John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd.

Funding information

Instituto de Salud Carlos III, Grant/Award number: FEDER FUNDS FIS PI15/01481; "Todos Somos Raros" (Telemaratón TVE promoted by Fundación Isabel Gemio, Federación ASEM, and Federación Española de Enfermedades Raras), Grant/Award number: IP-17

1 | INTRODUCTION

Smith-Kingsmore syndrome (SKS) (MIM 616638), also known as MINDS (ORPHA 457485), is a rare syndrome, first described by Smith et al¹ and caused by mutations in the mammalian target of rapamycin (*mTOR*, MIM 601231) gene. The most consistent findings in SKS are intellectual disability (ID), developmental delay, megalencephaly and seizures (Table 1). There is moderate clinical variability, ranging from patients with macrocephaly, mild ID, and no convulsions, to severe forms in patients with intractable epilepsy, megalencephaly, severe ID, and autistic spectrum disorder (ASD). Other non-neurological features include facial dysmorphisms and small thorax.

SKS belongs to the group of "mTORopathies," a term introduced to describe neurological disorders characterized by altered cortical architecture, abnormal neuronal morphology and intractable epilepsy as a consequence of mTOR signalling hyperactivation, providing probably a histopathological substrate for epileptogenesis.^{2,3} These mTORopathies-related epilepsies include: SKS, isolated hemimegalencephaly, ganglioglioma, focal cortical dysplasia (FCD), and tuberous sclerosis complex (TSC).^{2,4}

Macrocephaly and hemi/megalencephaly—with or without normal cortex—is a rather prevalent clinical feature among different types of vascular and/or overgrowth syndromes caused by germline or post-zygotic mutations in different genes in the PI3K-AKT-mTOR pathway: megalencephaly-polymicrogyria-polydactyly-hydrocephalus syndrome (AKT3 and *PIK3R2*),^{5,6} megalencephaly-capillary malformation (MCAP; *PIK3CA*),⁷ Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome (*PTEN*),⁸ Tenorio syndrome (*RNF125*),⁹ isolated hemimegalencephaly (*PIK3CA* and *AKT3*),¹⁰ and with syndromes with epilepsy, hemimegalencephaly and/or FCD due to mutations in *DEPDC5*, *NPRL2* and *NPRL3* genes, involved in mTORC1 regulation.¹¹ Axial skeletal overgrowth is not affected by mutations in *mTOR*, but megalencephaly is clearly a finding.¹² The main differences between the syndromes involved in this pathway are based on: (1) its germinal or somatic origin, causing generalized or segmental distribution patterns as in hemi or megalencephaly, (2) the degree of mosaicism, and (3) the presence of distinctive extra-cerebral manifestations, mostly the vascular malformations, nevi, and adipose overgrowth frequently found in the *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS).^{10,13–15}

The *mTOR* gene is a key regulator of cell growth, cell proliferation, protein synthesis and synaptic plasticity. The mTOR pathway is highly regulated and critical for cell survival and apoptosis. It is known that *mTOR* negatively regulates autophagy in response to growth factors, nutritional status and stress responses. Thus, it would appear that impaired autophagy in neurons is directly related to unregulated expression of *mTOR* and that this plays some role in epilepsy.¹² mTORC1 inhibitors, including drugs currently approved for a variety of conditions, are clinically available inducers of autophagy.

The prevalence of SKS, with 23 patients reported so far, is still unknown. We here report on 4 new SKS patients with *mTOR* mutations and review all the clinical characteristics and molecular aspects of this disorder. We also discuss some characteristics of patients with brain somatic mutations in *mTOR* who show some similarities with individuals with SKS.

TABLE 1 Clinical findings in Smith-Kingsmore syndrome (SKS)

Very common (observed in more than 75% of patients)		
Intellectual disability	24/26	92.3%
Macrocephaly/megalencephaly	24/27	88.9%
Seizures	17/23	73.9%
Frequent (observed in 25%-75% of patients)		
CNS anomalies (other than hemimegalencephaly)	16/24	66.7%
Curly/wavy hair	8/13	61.5%
Ventriculomegaly	13/24	54.2%
Macrosomia at birth/large for gestational age	12/27	44.4%
Speech anomaly	9/27	33.3%
Dysmorphic facial features	9/27	33.3%
Autistic spectrum disorder	8/27	29.6%
Rare (observed in less than 25% of patients)		
Hypotonia	5/27	18.5%
Diastasis recti/herniae	4/27	14.8%
Capillary malformation of the skin	4/27	14.8%
Hypomelanosis/patchy hypopigmentation of skin	4/27	14.8%
Strabismus	4/27	14.8%
Abnormal corpus callosum	4/27	14.8%
Small thorax	4/27	14.8%
Hyperactivity	3/27	11.1%
Café-au-lait spots	3/27	11.1%
Pes planus/talipes	3/27	11.1%
Abnormal gait	3/27	11.1%
Polymicrogyria	2/27	7.4%
Prominent abdomen	2/27	7.4%
Hemangiomas	2/27	7.4%
Iris colobomata	2/27	7.4%
Criptorchidism	2/27	7.4%
Asthma	2/27	7.4%
Lactose intolerance	2/27	7.4%
Hypospadias	1/27	3.7%
Neonatal hypoglycaemia	1/27	3.7%
IgA deficiency	1/27	3.7%
Persistent food allergies	1/27	3.7%
Intestinal polyps	1/27	3.7%

2 | PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients

All studies in this project were approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitario La Paz (reference PI-1919), with informed consent. We retrospectively reviewed the patients enrolled in the Spanish Overgrowth Registry (RESSC),¹⁶ selecting those with macrocephaly. Four patients from 3 families were finally enrolled. Patient 1 had macrocephaly and ID, and the other 3 patients were referred with clinical diagnosis of macrocephaly-capillary malformation.

To update the phenotype in SKS, we performed a retrospective review of the clinical characteristics including the 4 patients described herein, and the 23 patients previously reported to date (Table 2). These patients were ascertained from a series of patients with focal epilepsy, ID, brain anomalies and megalencephaly or hemimegalencephaly.^{1,12,17–22} Reported patients with only brain somatic mutations of *mTOR* were also reviewed.^{10,17,23–25}

2.2 | NGS studies

Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes from all patients. DNA was also extracted from saliva, hyperpigmented skin and hypopigmented skin samples from Patient 2.

A deep Next Generation Sequencing (NGS) panel, with an average expected reading depth of $\times 500$, was designed to study 20 genes known to cause developmental syndromes characterized by overgrowth and/or vascular anomalies in the form of somatic mosaicism: *mTOR*, *NRAS*, *AKT3*, *PIK3CA*, *FGFR3*, *RASA1*, *TSC1*, *GNAQ*, *PTEN*, *HRAS*, *PTPN11*, *KRAS*, *CCND2*, *AKT1*, *DICER1*, *TSC2*, *NF1*, *MAP3K3*, *PIK3R2*, and *AKT2*. NGS custom panel was designed with NimbleDesign software (Roche NimbleGen, Inc., Pleasanton, CA): hg19 NCBI Build 37.1/GRCh37, targeting $>98\%$ of all exons (RefSeq) for these genes. For each sample, paired-end libraries were created according to the standard NGS protocols KAPA HTP Library Preparation Kit for Illumina platforms, SeqCap EZ Library SR and NEXTflex-96 Pre Capture Combo Kit for indexing. The captured DNA samples were sequenced on a NextSeq 500 instrument (Illumina, Inc., San Diego, CA) according to the standard operating protocol.

The analysis of the sequenced reads was performed with 2 different in-house bioinformatic pipelines: germline and mosaic. In the germline pipeline, the reads were filtered and low-quality nucleotides were removed. Bowtie2²⁶ was used for mapping and local realignment/recalibration was performed around indels to improve possible mapping-related misalignment. The variant discovery was carried out by a combination of GATK Haplotype Caller²⁷ and LAConv (in preparation) tools.

In the mosaic pipeline, variants were analyzed with independent tools under very low constraints of quality and depth. Variants were identified with samtools mpileup²⁸ followed by variant calling using bcftools v1.3.²⁹ The quality per alignment and nucleotide were set to 0.7. Then, this first raw vcf file was annotated with their alternative variant allele fraction (AVAF) and the maximum of alternative variant allele fraction (MAVAF) in those sites with more than 1 alternative allele identified. The variants with AVAF below the threshold were

filtered. In addition, the vcf file was reformatted by splitting the multiallelic sites into these primitives and the variant positions were normalized. Finally, the vcf were enriched with information of the overlapping of each variant in a sample with the remaining samples of the run.

2.3 | Sanger sequencing and pyrosequencing

Non-mosaic heterozygous variants and variants present in more than 15% of the reads in the deep-sequencing data were validated by Sanger sequencing in DNA blood samples from patients, parents, and in sperm sample from the father of Patients 3 and 4 (siblings). Primers were previously designed using Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) and SNPs Check3 (<https://secure.ngl.org.uk/SNPCheck/>) tools. Sequencing was performed using polymerase chain reaction standard methods and a 96-capillary ABI 3730xl ADN analyser (Applied Biosystem, Foster, California). Mosaic variants between the 5% and 15% read fraction range were confirmed by pyrosequencing. Primers were designed with the PyroMark software, and pyrosequencing was performed with the PyroMark Q96 MD instrument (Qiagen, Hilden, Germany), according to manufacturer's protocol.

3 | RESULTS

3.1 | Clinical features in SKS

Clinical features in our 4 new patients with SKS and the review of the 23 patients previously described in the literature up to date, including clinical, radiological and genomic findings, are summarized in Table 2. Facial features in our patients are shown in Figure 1.

Macrocephaly and hemi/megalencephaly—mostly with central nervous system (CNS) magnetic resonance imaging (MRI) findings—were found in 88.9% of individuals with SKS. Mean values of macrocephaly in all reported patients is $+3.83 (\pm 0.98)$ SD, in the moderate to severe range. Hydrocephalus, ASD, seizures (see below) and attention deficit hyperactivity disorder (any of them) are usually present (Table 1). Generalized hypotonia may be present in small children with SKS. In some cases, only non-specific MRI abnormalities, including thin corpus callosum and/or ventricular dilatation, can be found. FCD seems to be more frequent in patients with brain mosaic mutations in *mTOR* than in patients with SKS.

Convulsions and associated symptoms are constant findings (73.9%). Electroencephalogram (EEG) anomalies includes: right occipitoparietal spikes and slow activity, theta activity intermixed with normal background activity, polyspike waves and slow waves activity, slow and sharp waves during sleep (both diffuse and focal), persistent diffuse sharp and slow wave activity, mild slow background, diffuse and centro-temporal epileptiform discharges, irregular slowing of background rhythms and frequent bursts of generalized slow wave convulsions.

ID is common in SKS, and may be severe, moderate or mild. It could appear alone or in combination with delay or absent speech, as well as distorted articulation.

TABLE 2 Clinical, radiological and genomic findings in 27 Smith-Kingsmore syndrome (SKS) patients with germline or constitutive mosaic mutations in *mTOR*

Year	Epi4k Consortium et al ²²				Baynam et al ²¹		Baynam et al ²¹		Mroske et al ¹⁹	
	Smith et al ¹	2013	2013	2013	2015	2015	2015	2015	2015	2015
Origin					Australian aborigine	Australian aborigine	Australian aborigine			
Intellectual disability (ID)					Patient 1	Patient 2	Patient 3	Proband		Brother
Age (y)	1.5	1.5	1.5	1.5	7	3	2	5	23	
Gender	F	M	M	M	F	M	M	M	M	
Weight/height postnatal	N				N	N		N	N	
Megalencephaly/macrocephaly	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
OFC	>+3 SD				>+3 SD	>+3 SD	>+3 SD	+5 SD	+5 SD	
Large for gestational age	-				-	+	+	+	+	
Autism										
Hyperactivity					+			+	+	
Intellectual disability	+				Severe	Severe	Severe	Moderate	+	
Speech								Delay	Delay	
Seizures	Intractable	+	+	+	+	+	+	-	-	
Diastasis recti or umbilical herniae	+				+	+	+			
Other	Face: NSLF, large anterior fontanelle, frontal bossing, midface hypoplasia, small chin. Hypertelorism, downslanting palpebral fissures, depressed nasal bridge. Full and widely spaced brows. Thick eyelashes. Other: hypotonia. Hypoglycemia and thrombocytopenia, sacral cleft, umbilical hernia, hands had a trident appearance with short proximal phalanges.	Seizures: infantile spasms and myoclonic epilepsy.	Face NSLF8. Abdominal region: prominent. Hepatomegaly at 20 wk gestation. Renal asymmetry. Skin: CLS. Other: Rocker-bottom heels, pes planus, broad feet, an ossifying anterior fontanel, large ear lobes. Aortic sinus to right atrial fistula.	Face NSLF8. Chest: small in infancy. Abdominal region: prominent. Skin: CLS. Deep palmar and plantar creases. Other: IgA deficiency.	Face NSLF8. Chest: small in infancy. Abdominal region: prominent. Skin: CLS. Deep palmar and plantar creases.	Eyes: 3, genitalia: 5, other: 6	Eyes: 4, genitalia: 5, Other: 7			
CNS image	Callosal dysgenesis and mild dilatation of the posterior horns of the lateral ventricles.	Mild prominence of the ventricular system, hypogenesis of the body and the splenium of the corpus callosum, generalized white	Megalencephaly, perisylvian polymicrogyria, mild prominence of the lateral ventricles, moderate hypogenesis	Megalencephaly						Mild ventricular prominence, hypoplastic CC, small medulla

TABLE 2 (Continued)

	Smith et al ¹	Epi4k Consortium et al ²²	Baynam et al ²¹	Baynam et al ²¹	Baynam et al ²¹	Mroske et al ¹⁹	Mroske et al ¹⁹
			matter loss, particularly in the peritrigonal regions. Small mesencephalon, pons and medulla.	of the corpus callosum, heterotopic grey matter in the right frontal lobe, small left middle cranial fossa.			
Genomic change	c.4448G>T	c.4785G>A	c.5395G>A	c.5395G>A	c.5395G>A	c.5395G>A	c.5395G>A
Protein change	p.Cys1483Phe	p.Met1595Ile	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys
Type of mutation	Probably GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF
Type of inheritance	de novo	de novo	Maternal gonadal mosaicism	Maternal gonadal mosaicism	Maternal gonadal mosaicism	Gonadal mosaicism	Gonadal mosaicism
	Mirzaa et al ¹⁸	Mirzaa et al ¹⁸	Mirzaa et al ¹⁸	Mirzaa et al ¹⁸	Ghahramani et al ²⁰	Ghahramani et al ²⁰	Moller et al ¹⁷
Year	2016	2016	2016	2016	2015	2015	2016
Origin							Danish
ID	LR12-379a1	LR12-379a2	LR14-012	LR15-065	Case 1	Case 2	Patient 7
Age (y)	17	17	3				8
Gender	M	M	F	M			F
Weight/height postnatal	N	N	N	N			
Megalencephaly/macrocephaly	+	+	+	+	+	+	+
OFC							+3.31 SD
Large for gestational age					+	+	
Autism	+	+	+		+	+	
Hyperactivity							
Intellectual disability	+	+	+	Mild	+	+	
Speech	Absent	Absent					
Seizures	+	+			+	+	+
Diastasis recti or umbilical herniae					-	-	
Other		Skin: 1	Abdominal region: 2	Face: dysmorphic facial features. Skin: hypomelanosis of Ito.	Face: dysmorphic facial features. Skin: hypomelanosis of Ito.		
CNS image	Megalencephaly	Megalencephaly	Mild dysmyelination mild ventriculomegaly	Subtle undersulcation, mild dysmyelination, moderate ventriculomegaly	Hemimegalencephaly	Hemimegalencephaly	
Genomic change	c.5395G>A	c.5395G>A	c.5395G>A	c.5395G>A	c.5395G>A	c.4448G>A	c.5494G>A
Protein change	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys	p.Cys1483Tyr	p.Ala1832Thr

TABLE 2 (Continued)

Type of mutation	Mirzaa et al ¹⁸ GOF	Mirzaa et al ¹⁸ GOF	Mirzaa et al ¹⁸ GOF	Mirzaa et al ¹⁸ GOF	Ghahramani et al ²⁰ GOF	Ghahramani et al ²⁰ Probably GOF	Moller et al ¹⁷
Type of inheritance	Moller et al ¹⁷ 2016 Danish Patient 8a 44 F	Moller et al ¹⁷ 2016 Danish Patient 8b 70 F	Moller et al ¹⁷ 2016 Italian Patient 9 6 M	Moller et al ¹⁷ 2016 USA Patient 10a 23 F	Moller et al ¹⁷ 2016 USA Patient 10b 23 F	Moller et al ¹⁷ 2016 USA Patient 11 8 M	Moller et al ¹⁷ 2016 USA Patient 12 2.5 F
Weight/height postnatal	-	-	+	+	+	-	+
Megalencephaly/macrocephaly	-	-	+	+	+	-	+
OFC	-0.11 SD	+1.52 SD	+2.8 SD	+5.8 SD	+4.9 SD	+0.95 SD	+4.1 SD
Large for gestational age							
Autism							
Hyperactivity							Behavioural outbursts
Intellectual disability	-	-	Mild	+	+	+	Moderate
Speech				Delay	Delay		
Seizures	+	+	+	+	+	+	-
Diastasis recti or umbilical herniae							
Other	No dysmorphic features	No dysmorphic features	No dysmorphic features	Facial dysmorphism: prominent forehead, low-set ears, gingival hyperplasia, frontal bossing, kyphosis, micrognathia, long thin extremities. Other: hypotonia, shuffling gait.	Facial dysmorphism: prominent forehead, low-set ears, gingival hyperplasia, frontal bossing, kyphosis, micrognathia, long thin extremities. Other: hypotonia, shuffling gait.	Dysmorphology not carried out. Other: Ataxic gait.	Facial dysmorphism: frontal bossing, broad depressed nasal root, coarse facial features
CNS image	Incomplete inversion of left hippocampus, pineal gland cyst, arachnoidal cyst at 42 y (1.5 T)	Normal	Thin corpus callosum, ventricular dilatation at 2 y 8 mo and 5 y (3 T)	Ventricular prominence with mild extra ventricular enlargement at 6 mo (1.5 T)	Mild ventricular prominence at 6 mo (1.5 T)	Normal at 18 mo	Mild ventricular dilatation and increased extra-axial spaces at 20 mo (1.5 T)
Genomic change	c.7501A>G	c.7501A>G	c.4468T>C	c.5663T>G	c.5663T>G	c.4785G>A	c.6981G>A
Protein change	p.Ile2501Val	p.Ile2501Val	p.Trp1490Arg	p.Phe1888Cys	p.Phe1888Cys	p.Met1595Ile	p.Met2327Ile
Type of mutation							

TABLE 2 (Continued)

Type of inheritance	Moller et al ¹⁷		Moller et al ¹⁷		Moller et al ¹⁷		Moller et al ¹⁷		Moller et al ¹⁷		Moller et al ¹⁷	
	Germine maternal	Moosa et al ¹²	Transmitted to daughter	Germine de novo	Germine de novo (twin pair)	Germine de novo (twin pair)	Germine de novo (twin pair)	Germine de novo (twin pair)	Germine de novo (twin pair)	Germine de novo (twin pair)	Germine de novo (twin pair)	Germine de novo (twin pair)
	Moosa et al ¹²	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
Year	2017	2017	2016	2016	2016	2016	2016	2016	2016	2016	2016	2016
Origin	Germany	Germany	Spain	Spain	Spain	Spain	Spain	Spain	Spain	Spain	Spain	Spain
ID	Index	Younger brother	OGS771	OGS1464	OGS1092	OGS1093	OGS1093	OGS1093	OGS1093	OGS1093	OGS1093	OGS1093
Age (years)	7	2.5	16	8	9	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5
Gender	F	M	M	M	F	M	M	M	M	M	M	M
Weight/height postnatal		Tall	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Megalencephaly/macrocephaly	+	+	+	+	Progressive	Progressive	Progressive	Progressive	Progressive	Progressive	Progressive	Progressive
OFC	+4.9 SD	+4 SD	>+4 SD	+4 SD	>+3 SD	>+6.5 SD	>+6.5 SD	>+6.5 SD	>+6.5 SD	>+6.5 SD	>+6.5 SD	>+6.5 SD
Large for gestational age	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Autism		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hyperactivity		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Intellectual disability	+	+	Mild-moderate	+	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe
Speech		Delay	Delay	Delay	Delay	Delay	Delay	Delay	Delay	Delay	Delay	Delay
Seizures		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Diastasis recti or umbilical herniae		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Other	Abdominal region: multiple polyps in the ileum, cecum, and colon. Bilateral cystic kidneys (inherited from his father).	Face: deep set eyes, triangular, small chin. Other: large hands, camptodactyly.	Face: hypertelorism, open mouth appearance and smooth philtrum. Skin: hyperpigmentation following Blaschko lines in arms and legs. Other: Strabismus. Hypotonia, neonatal hypoglycaemia. Hypospadias.	Face: facial capillary malformation, smooth philtrum. Skin: capillary malformation in shoulders, and areas of hypopigmentation and hyperpigmentation. Other: Strabismus. Delayed bone age, hypotonia.	Face: smooth philtrum, posteriorly rotated ears. Skin: reticular capillary malformation, peri-axillary capillary malformation. Other: Bilateral talipes equinovarus, hypotonia, decreased subcutaneous fat, delayed bone age.							
CNS image	Mildly dilated ventricles	Megalencephaly	Ventriculomegaly, gliosis, cavum vergae, periventricular venous malformation	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Genomic change	c.5395G>A	c.5395G>A	c.5395G>A	c.4448G>A	c.6605T>G	c.6605T>G	c.6605T>G	c.6605T>G	c.6605T>G	c.6605T>G	c.6605T>G	c.6605T>G
Protein change	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys	p.Glu1799Lys	p.Cys1483Tyr	p.Phe2202Cys	p.Phe2202Cys	p.Phe2202Cys	p.Phe2202Cys	p.Phe2202Cys	p.Phe2202Cys	p.Phe2202Cys	p.Phe2202Cys
Type of mutation	GOF	GOF	GOF	GOF	Probably GOF	Probably GOF	Probably GOF	Probably GOF	Probably GOF	Probably GOF	Probably GOF	Probably GOF
Type of inheritance	Gonadal mosaicism	Gonadal mosaicism	Germine de novo	Mosaic in all studied tissues (blood, saliva, skin)	Gonadal mosaicism (probably maternal)	Gonadal mosaicism (probably maternal)	Gonadal mosaicism (probably maternal)	Gonadal mosaicism (probably maternal)	Gonadal mosaicism (probably maternal)	Gonadal mosaicism (probably maternal)	Gonadal mosaicism (probably maternal)	Gonadal mosaicism (probably maternal)

Abbreviations: GOF, gain-of-function. OFC, occipitofrontal circumference. NSLF, Noonan syndrome-like face. CLS, CAFE-au-lait lesion(s). CNS, central nervous system. CC, corpus callosum.



FIGURE 1 Facial features of patients with Smith-Kingsmore syndrome. Patients 1, 2, 3 and 4 show mixed characteristics of the 2 different phenotypes or *gestalts* described so far: macrocephaly (P1, P2, P3, P4), large forehead (P2, P3, P4), bitemporal narrowing (P1, P3, P4), hypertelorism (P2, P3, P4), downslanting palpebral fissures (P4), an open mouth appearance (P1, P2, P4), long philtrum (P3, P4), and triangular face with pointed chin (P1, P3, P4). Uncommon clinical features included facial capillary malformation (slightly appreciable in P3), deep set eyes (P1), strabismus (P3), smooth philtrum (P2, P3, P4) and posteriorly rotated ears (P4)

Some patients exhibit, when reported, a pattern of facial dysmorphology. At least 2 different phenotypes or *gestalts* have been described. One group of patients present a Noonan syndrome-like aspect, including curly hair, frontal bossing, tall forehead, downslanting palpebral fissures, bitemporal narrowing, an open mouth appearance, a prominent and long philtrum, flat nasal bridge, macrostomia,

an open mouth posture, hypertelorism, and a short nose with a depressed nasal bridge. Other individuals show only large forehead, macrocephaly and triangular face, with pointed chin, or a face without a constant pattern or typical *gestalt* (Figure 1). The neck may be short or normal. Only a few patients have a webbed neck.

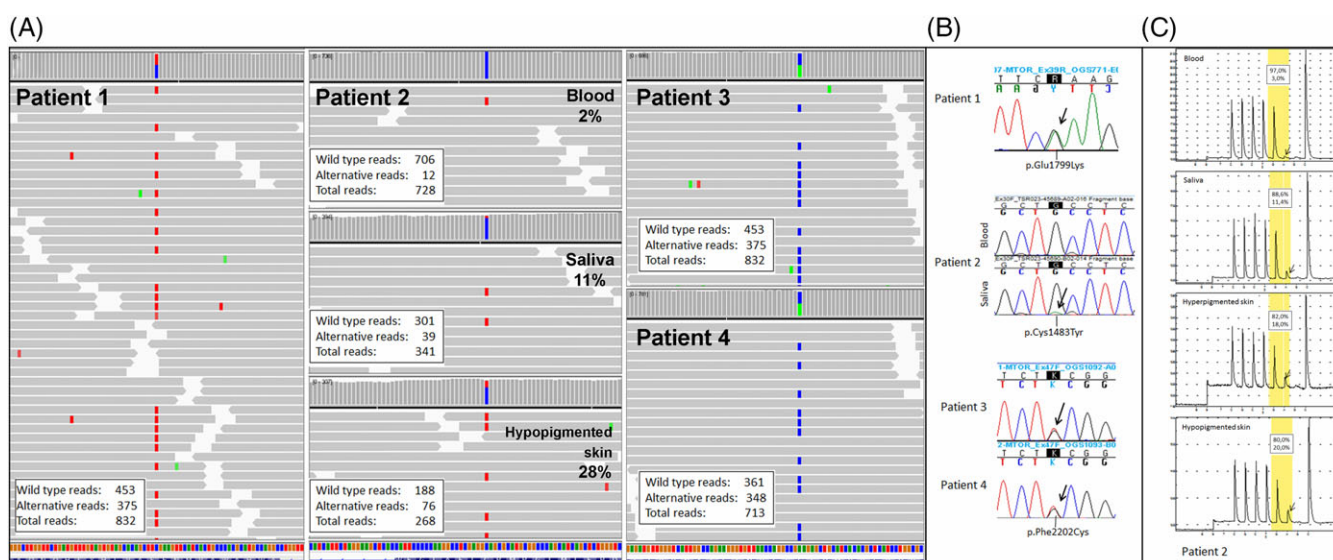


FIGURE 2 Next-generation sequencing results and variants validation by Sanger sequencing or pyrosequencing. (A) de novo *mTOR* heterozygous variant c.5395G>A (p.Glu1799Lys) in Patient 1, constitutive mosaic variant c.4448G>A (p.Cys1483Tyr) in Patient 2 with different mosaicism levels in blood, saliva and hypopigmented skin, and the heterozygous variant c.6605T>G (p.Phe2202Cys) in Patients 3 and 4. (B) Sanger sequencing showing variants from Patients 1 to 4. For Patient 2, Sanger from saliva sample shows a very low peak of A (panel B: Patient 2, black arrow) representing the low mosaicism. (C) Pyrosequencing results from different sample types in Patient 2. Black arrows show different mosaicism levels in each tissue (blood 3%, saliva 11.4%, hyperpigmented skin 18% and hypopigmented skin 20%)

TABLE 3 (Continued)

	Lim and Lee ²³	Nakashima et al ²⁴	Nakashima et al ²⁴	Nakashima et al ²⁴	Nakashima et al ²⁴	Nakashima et al ²⁴	Nakashima et al ²⁴	Nakashima et al ²⁴	Nakashima et al ²⁴	Moller et al ¹⁷	Moller et al ¹⁷	Moller et al ¹⁷	Moller et al ¹⁷	Moller et al ¹⁷	Moller et al ¹⁷
Type of mutation	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF
Type of inheritance	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic	Somatic

Abbreviations: ACS, abnormal cerebral sulcation; AGWM, abnormality of the gray-white matter; ASz, atonic seizures; BC, balloon cells; BCL, balloon cells-like; CD, cortical dyslamination; CEM, clonic eye movements; CN, cytomegalic neuron; CPS, complex partial seizure; Csz, clonic seizures; DCD, diffuse cortical dysplasia; DN, dysmorphic neurons; ED, eye deviation; EN, ectopic neurons; F, female; FCD, focal cortical dysplasia; FDS, focal dyscognitive seizures; GE, gestural automatism; GOF, gain-of-function; IED, interictal epileptiform discharges; LPPF, left fronto-parietal focus; LHD, left head deviation; LOC, loss of consciousness; M, male; NA, not applicable; NSz, nocturnal seizures; RHD, right hand dystonia; sGTCS, secondarily generalized tonic-clonic seizure; sz, seizure; TSz, tonic seizures; VDLCH, volume decreased of the left cerebral hemisphere.

Some patients had capillary malformations—similar to those observed in MCAP—hemangiomata, hepatic vascular malformations, and a small thorax with protruding abdomen. Unlike some over-growth syndromes, visceromegaly is not common. Cryptorchidism has been observed only in 2 siblings, and one patient also had hypospadias. Multiple intestinal polyps described by Moosa et al in a 7-year-old brother¹² should be taken into account in SKS as reported patients may not have been evaluated for this or may not be old enough to have developed polyps yet.

3.2 | Molecular results

There is no clear genotype-phenotype correlation in either the 27 patients with SKS or in the 27 cases described with somatic brain alteration. The variants described are located along all exons of *mTOR*. However, there are some hotspots: the c.5395G>A;p. Glu1799Lys gain-of-function (GOF) variant affecting the FRAP-ATM-TTRAP (FAT) domain of the protein has been detected in 48.1% (13/27) of SKS patients (Figure 2, Table 2), and in cases with brain somatic *mTOR* variants the most frequently affected amino acid is the serine at position 2215 (p.Ser2215Phe and p.Ser2215Tyr), found in 37% (10/27) of the patients (Table 3). The remaining patients with SKS or somatic alterations had different less or not recurrent mutations, mostly affecting the FAT (22/31, 71.0%) and kinase (6/31, 19.4%) domains of the protein (Figure 3). No mutations have been described in the FKBP12-rapamycin-binding (FRB) or C-terminal FAT (FATC) domains, neither in SKS nor in somatic cases. The penetrance in SKS seems to be 100% as all patients with a germline or mosaic *mTOR* mutation have had clinical findings; however, this may change in the future due to current ascertainment bias.

Germline *mTOR* mutations have been found in 92.6% (25/27) of the patients with SKS. One of the patients reported by Ghahramani, as well as Patient 2 (P2) described in this study, had constitutive, mosaic *mTOR* mutations, because the mutated allele was detected in low percentages in all tissues studied, including blood. Case 2 from Ghahramani showed increased abundance of the mutant allele in the affected skin (36%) vs blood (1%).²⁰ In our study, Patient 2 showed by NGS the mutant allele in 2% (12/720) of the reads in blood sample, 11% (39/341) in saliva, 18% (only by pyrosequencing) in hyper-pigmented skin, and 28% (76/268) in hypopigmented skin, all confirmed by pyrosequencing (Figure 2).

In 9 out of 27 SKS patients (33.3%) gonadal mosaicism has been suspected. In the case of the family studied by Baynam et al, the mutation p.Glu1799Lys was transmitted in the mother's germline, as all 3 children had different fathers.²¹ In the family reported by Mroske et al, the mutation p.Glu1799Lys found in 2 siblings (of 6 and 23 years) was not detected in blood sample of either parent.¹⁹ In the family reported by Moosa et al, high-depth sequencing of parental blood samples did not detect the presence of mosaicism for the mutation p.Glu1799Lys, which could be localized in the chromosome of paternal origin.¹² In the family described herein the mutation p. Phe2202Cys was detected in blood samples from the 2 siblings, and was not present in blood samples from either parent or sperm sample from the father, thus maternal gonadal mosaicism is suspected.

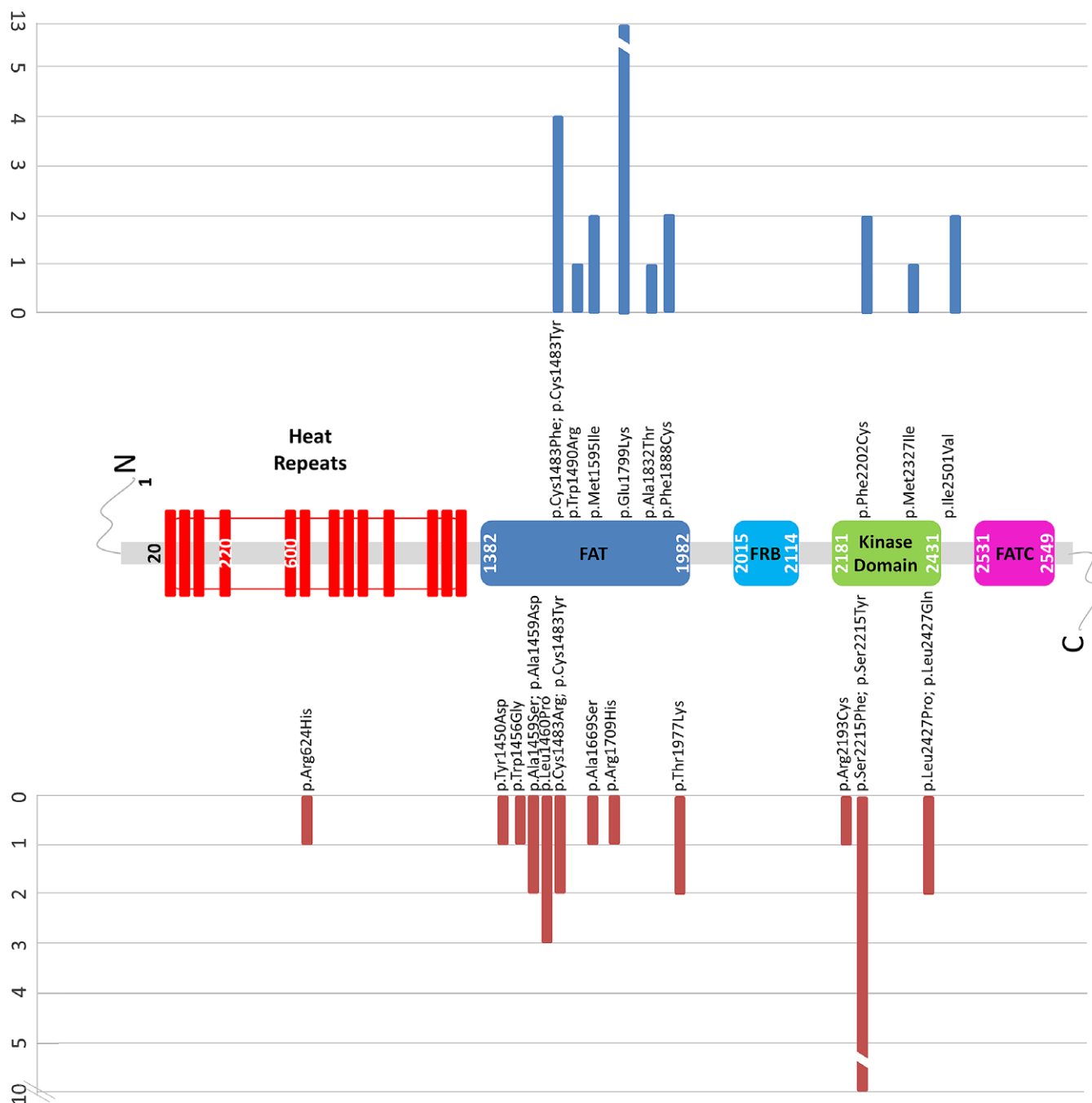


FIGURE 3 Germline mutations described in *mTOR* in patients with Smith-Kingsmore syndrome (upper panel, blue bars) and somatic mutations in patients with only brain involvement (lower panel, red bars). Data represent the localization and the frequency for each *mTOR* mutation. N: N terminus; C: C terminus. Note that the vast majority of germline mutations (blue bars) clustered in the FAT and kinase domains

4 | DISCUSSION

SKS is a rare, recently described disorder of the *mTOR* pathway. We report 4 new patients, review the literature for previously published cases of SKS, and compare them with reported cases of brain somatic *mTOR* variants.

SKS belongs to the group of “*mTOR*opathies,” which also includes patients with *mTOR* somatic mutations—as tissue mosaicism—including neoplastic tissues (Table 3), and patients with mutations in other *mTOR* regulatory genes (eg, *TSC1*, *TSC2*, *AKT3*, *DEPDC5*) (Figure 4). We have decided to maintain the eponym SKS

only for patients with *mTOR* mutations present in all tissues, either germinal or as a constitutive mutation present in mosaic form, therefore present in all cell types but not in 100% of the cells, to which hereafter we will call “constitutive mosaicism.”

Analysing the 4 patients described here and the 23 cases of SKS previously reported in the literature, we have seen that the major diagnostic features of SKS are ID (92.3%), macrocephaly/megalencephaly or hemimegalencephaly (88.9%) and seizures (73.9%). Non-neurological symptoms are also common, and a facial gestalt is variably present and can include some Noonan-like facial features and an open mouth appearance. Nevertheless, because the 23 patients

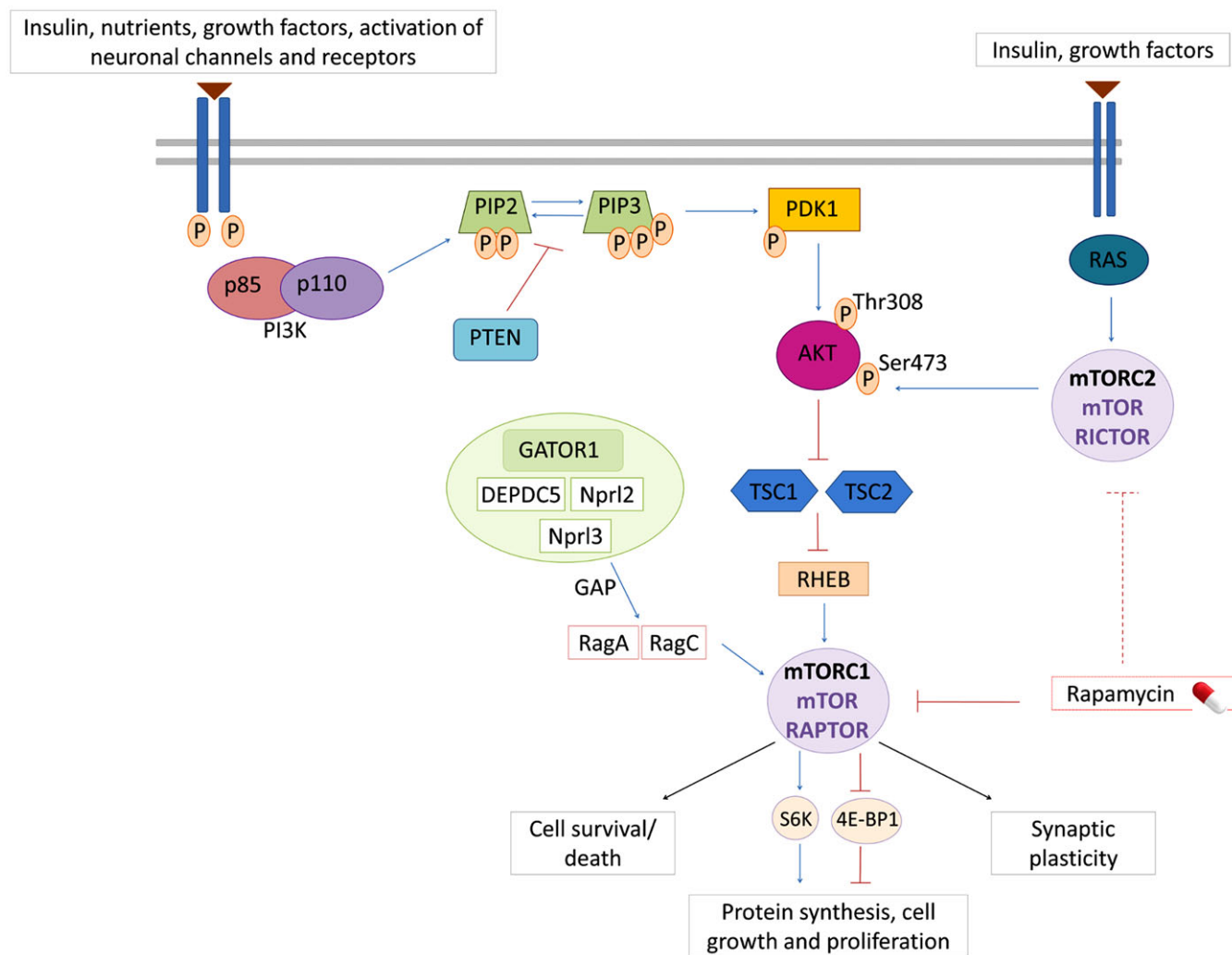


FIGURE 4 The PI3K/PTEN-mTOR pathway regulating cell growth and proliferation. mTOR is activated by signalling through the PI3K-Akt pathway. PTEN, TSC1, and TSC2 act as negative regulators of the mTOR pathway, and removal or loss-of-function mutations lead to hyperactivation of mTOR. mTOR complex 1 (mTORC1) signalling requires activation of the adaptor protein Raptor, and mTOR complex 2 (mTORC2), which is largely insensitive to acute rapamycin treatment, requires activation of the Rictor protein. GATOR1: GAP activity toward Rags (GATOR) complex is composed by Depdc5, Npr12 and Npr13. DEPDC5 along with TSC1 and TSC2, acts as a negative regulator of mTORC1. Both TSC1 and TSC2 provide critical regulation of mTORC1 through the GTPase-activating protein (GAP) activity of the TSC protein complex towards the RHEB GTPase. Similarly, the GATOR1 complex provides critical regulation of mTORC1 through its GAP activity on the Rag GTPases. Loss of either of these protein complexes through loss of any one of their critical protein components leads to high-level activation of mTORC1, and downstream effects on anabolic processes, including synthesis of all components needed for organelle synthesis, protein translation, and an increase in cell size

previously described were ascertained from a series of patients with focal epilepsy, ID, brain anomalies and megalencephaly or hemimegalencephaly, there could be a bias toward neurological phenotypes, giving less importance, or not reporting, other clinical manifestations more frequently described in (germline or somatic) syndromes of the PI3K-AKT-mTOR pathway. Remarkably, 3 of the 4 patients described here were referred with an initial diagnosis of MCAP, showing common features in patients with somatic *PIK3CA* mutations (nevus, skin hyperpigmentation, etc.). Thus, *mTOR* mutations should be considered in those patients with phenotypic overlap with the *PIK3CA* spectrum or other syndromes within this pathway. A list of relatively common findings can be found in Table 1.

The variants in *mTOR* in patients with SKS are distributed all over the gene, and there is great phenotypic variability within patients

showing the same mutation, even among those with germline mutations. As with most vascular and/or overgrowth syndromes within the differential diagnosis, all *mTOR* mutations reported in patients with SKS cause GOF in the pathway. However, there are no clear genotype-phenotype correlations. Mutations in the FAT domain are frequent, especially the recurrent variant p.Glu1799Lys, detected in 48.1% of the patients with SKS. It has been functionally showed that some mutations in the FAT domain, especially the variant Cys1483Phe, detected in 3/27 patients with SKS and 2/27 patients with only brain *mTOR* somatic mutations, may decrease the binding of the mTOR endogenous inhibitor Deptor. This suggests that mutations in the FAT protein domain could increase mTOR activity by a decrease in its inhibition; still, it cannot be ruled out that these mutations, as well as mutations outside the FAT domain, generate an increase of mTOR kinase activity.³⁰

Gonadal mosaicism, both of maternal and paternal origin, seems to be highly common in SKS (33.3%), which has implications for genetic counselling. Specifically, a relatively high recurrence risk, compared to de novo mutations, should be considered, although precise recurrence risks cannot currently be provided. A recent hypothesis proposed that the *mTOR* GOF mutation p.Glu1799Lys—present in the 3 families with gonadal mosaicism described then—represents a mutational hotspot in somatic cells (eg, germline and colorectal tissues)¹². However, these figures may change in the future due to current ascertainment bias.

Germinal mutations, either de novo, inherited from affected parents or due to gonadal mosaicism, were present in 92.6% of the patients with SKS. However, 2 of the 27 patients with SKS have mosaic *mTOR* mutations in all tissues studied, which has important implications for accurate molecular diagnosis (traditional techniques do not detect low mosaicism) and for genetic counselling (ie, recurrence risk and follow-up). It has been suggested that the percentage of mosaicism in somatic mutations could be correlated with the extent of the cerebral malformation,¹⁸ but this is not the case in all patients. Some patients with germinal mutations only present neurological symptoms and some do not show cerebral malformations, in contrast to reported individuals with somatic (Table 3) mutations.¹⁷

These differences could be explained if germline mutations were less activating than somatic mutations, or by the undetected presence of other affected genes, either with germinal or somatic involvement.¹⁷ Perhaps a combination of these two lies behind the lack of correlation between genotype and phenotype. Different *mTOR* mutations could have different effects on the pathway, especially if it is already differentially modulated by other variant/s in other gene/s. In addition, clarifying these aspects could be of great importance for the use of *mTOR* inhibitors such as rapamycin, as it efficiently inhibits mTORC1 but not mTORC2, two complexes with different downstream functions (Figure 4). A recent study in renal cell carcinomas reported that although mutations in the FAT domain of *mTOR* led to an increase in both mTORC1 and mTORC2 activities, several of these mutations showed residual *mTOR* kinase activity after treatment with rapamycin at clinically relevant doses.³¹ More studies on the effects of different *mTOR* mutations, as well as on other types of small molecules able to modulate the PI3K/AKT/*mTOR* pathway, are needed.

Diagnosis in SKS is suspected on the clinical findings and is molecularly confirmed with the detection of germline or constitutive mosaic mutations in *mTOR*. Due to the wide differential diagnosis, as well as to the possibility of mosaicism—with variable alternative allele fractions depending on the studied tissue—we recommend an approach based on the use of deep coverage NGS, testing all genes in the differential diagnosis. Consistent with the gain of function mutations observed in SKS, microdeletions of the gene have not been reported. No biochemical or serologic pathognomonic markers have been documented in patients with SKS. Management in SKS includes treatment of epilepsy and multidisciplinary support. Possible future treatments with rapamycin, or other *mTOR* inhibitors, may be promising for the prevention of neurocognitive manifestations, including epilepsy, but still needs to be tested.³²

In conclusion, SKS, caused by germline or mosaic mutations in the *mTOR* gene, is a recently described and clinically discernible

disorder characterized mainly by ID, macrocephaly/hemi/megalencephaly, and seizures. Facial dysmorphism and other non-neurological manifestations, may also provide diagnostic clues in some individuals. However, there is a high phenotypic overlap with other syndromes associated with the PI3K-AKT/*mTOR* pathway (ie, MCAP). Since the best tool to make a clinical diagnosis is to think about a specific diagnostic possibility, this paper presents for the first time an in-depth review of this rare disease, which may help not only in the improvement of the clinical diagnosis but also in the diagnostic approach. We have also confirmed mosaic *mTOR* mutations present in all studied tissues (including blood) as a cause in SKS, which have consequences in terms of phenotype and diagnosis. Similarly, the review of all available aspects to date may also be of interest for further clinical management, follow-up, and therapeutic approaches (ie, *mTOR* inhibitors) on this group of patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the project IP-17 from the call “Todos Somos Raros” (Telemaraton TVE promoted by Fundación Isabel Gemio, Federación ASEM, and Federación Española de Enfermedades Raras), and co-financed by ISCIII, FEDER FUNDS FIS PI15/01481.

Conflict of interest

Nothing to declare.

ORCID

J. Tenorio  <http://orcid.org/0000-0002-5308-2316>

M. Palomares-Bralo  <http://orcid.org/0000-0002-2727-7654>

V. Martinez-Glez  <http://orcid.org/0000-0002-4680-881X>

P. Lapunzina  <http://orcid.org/0000-0002-6324-4825>

REFERENCES

- Smith LD, Saunders CJ, Dinwiddie DL, et al. Exome sequencing reveals de novo germline mutation of mammalian target of rapamycin (MTOR) in a patient with megalencephaly and intractable seizures. *J Genomes Exomes*. 2013;2:10.
- Citraro R, Leo A, Constanti A, et al. *mTOR* pathway inhibition as a new therapeutic strategy in epilepsy and epileptogenesis. *Pharmacol Res*. 2016;107:333–343.
- Curatolo P, Moavero R. *mTOR* inhibitors as a new therapeutic option for epilepsy. *Expert Rev Neurother*. 2013;13:627–638.
- Crino PB. *mTOR*: a pathogenic signaling pathway in developmental brain malformations. *Trends Mol Med*. 2011;17:734–742.
- Mirzaa G, Timms AE, Conti V, et al. PIK3CA-associated developmental disorders exhibit distinct classes of mutations with variable expression and tissue distribution. *JCI Insight*. 2016;1(9):e87623.
- Mirzaa GM, Conway RL, Gripp KW, et al. Megalencephaly-capillary malformation (MCAP) and megalencephaly-polydactyly-polymicrogyria-hydrocephalus (MPPH) syndromes: two closely related disorders of brain overgrowth and abnormal brain and body morphogenesis. *Am J Med Genet A*. 2012;158A:269–291.
- Keppeler-Noreuil KM, Rios JJ, Parker VE, et al. PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. *Am J Med Genet A*. 2015;167A:287–295.

8. Eng C. PTEN Hamartoma Tumor Syndrome. 2001 Nov 29 [Updated 2016 Jun 2]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews*®[Internet]. Seattle, WA: University of Washington, Seattle; 1993-2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1488/>.
9. Tenorio J, Mansilla A, Valencia M, et al. A new overgrowth syndrome is due to mutations in RNF125. *Hum Mutat*. 2014;35:1436–1441.
10. Lee JH, Huynh M, Silhavy JL, et al. De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. *Nat Genet*. 2012;44:941–945.
11. Baldassari S, Licchetta L, Tinuper P, et al. GATOR1 complex: the common genetic actor in focal epilepsies. *J Med Genet*. 2016;53:503–510.
12. Moosa S, Bohrer-Rabel H, Altmüller J, et al. Smith-Kingsmore syndrome: a third family with the MTOR mutation c.5395G>A p. (Glu1799Lys) and evidence for paternal gonadal mosaicism. *Am J Med Genet A*. 2017;173:264–267.
13. Parrini E, Conti V, Dobyns WB, et al. Genetic basis of brain malformations. *Mol Syndromol*. 2016;7:220–233.
14. Riviere JB, Mirzaa GM, O'Roak BJ, et al. De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet*. 2012;44:934–940.
15. Poduri A, Evrony GD, Cai X, et al. Somatic activation of AKT3 causes hemispheric developmental brain malformations. *Neuron*. 2012;74:41–48.
16. Lopez-Gutierrez JC, Lapunzina P. Capillary malformation of the lower lip, lymphatic malformation of the face and neck, asymmetry and partial/generalized overgrowth (CLAPO): report of six cases of a new syndrome/association. *Am J Med Genet A*. 2008;146A:2583–2588.
17. Moller RS, Weckhuysen S, Chipaux M, et al. Germline and somatic mutations in the MTOR gene in focal cortical dysplasia and epilepsy. *Neurol Genet*. 2016;2:e118.
18. Mirzaa GM, Campbell CD, Solovieff N, et al. Association of MTOR mutations with developmental brain disorders, including megalencephaly, focal cortical dysplasia, and pigmentary mosaicism. *JAMA Neurol*. 2016;73:836–845.
19. Mroske C, Rasmussen K, Shinde DN, et al. Germline activating MTOR mutation arising through gonadal mosaicism in two brothers with megalencephaly and neurodevelopmental abnormalities. *BMC Med Genet*. 2015;16:102.
20. Ghahramani NK, Ghahramani S, Lee H, Strom S, Deignan J, Grody W, Nelson S, Vilain E, Martinez-Agosto J. Activating mutations in mTOR cause human overgrowth associated with macrocephaly, intellectual disability, and distinct dysmorphic features. ACMG Annual Clinical Genetics Meeting. Salt Lake City, Utah, 2015.
21. Baynam G, Overkov A, Davis M, et al. A germline MTOR mutation in Aboriginal Australian siblings with intellectual disability, dysmorphism, macrocephaly, and small thoraces. *Am J Med Genet A*. 2015;167:1659–1667.
22. Epi4K Consortium, Epilepsy phenome/genome project, Allen AS, et al. De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature*. 2013;501:217–221.
23. Lim JS, Lee JH. Brain somatic mutations in MTOR leading to focal cortical dysplasia. *BMB Rep*. 2016;49:71–72.
24. Nakashima M, Saitsu H, Takei N, et al. Somatic mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb. *Ann Neurol*. 2015;78:375–386.
25. Leventer RJ, Scerri T, Marsh AP, et al. Hemispheric cortical dysplasia secondary to a mosaic somatic mutation in MTOR. *Neurology*. 2015;84:2029–2032.
26. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012;9:357–359.
27. Pirooznia M, Kramer M, Parla J, et al. Validation and assessment of variant calling pipelines for next-generation sequencing. *Hum Genomics*. 2014;8:14.
28. Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*. 2011;27:2987–2993.
29. J LHHBDPMSM. bcftools—utilities for variant calling and manipulating VCFs and BCFs. The MIT License. Genome Research Ltd.
30. Grabiner BC, Nardi V, Birsoy K, et al. A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity. *Cancer Discov*. 2014;4:554–563.
31. Ghosh AP, Marshall CB, Coric T, et al. Point mutations of the mTOR-RHEB pathway in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6:17895–17910.
32. Clossen BL, Reddy DS. Novel therapeutic approaches for disease-modification of epileptogenesis for curing epilepsy. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1863:1519–1538.
33. D'Gama AM, Geng Y, Couto JA, et al. Mammalian target of rapamycin pathway mutations cause hemimegalencephaly and focal cortical dysplasia. *Ann Neurol*. 2015;77:720–725.

How to cite this article: Gordo G, Tenorio J, Arias P, et al. mTOR mutations in Smith-Kingsmore syndrome: Four additional patients and a review. *Clin Genet*. 2018;1–14. <https://doi.org/10.1111/cge.13135>

Hypoinsulinaemic, hypoketotic hypoglycaemia due to mosaic genetic activation of PI3-kinase

Sarah M Leiter^{1,2}, Victoria E R Parker^{1,2}, Alena Welters³, Rachel Knox^{1,2}, Nuno Rocha^{1,2}, Graeme Clark⁴, Felicity Payne⁵, Luca Lotta⁶, Julie Harris^{1,2}, Julio Guerrero-Fernández⁷, Isabel González-Casado⁷, Sixto García-Miñaur⁸, Gema Gordo⁸, Nick Wareham⁶, Víctor Martínez-Glez⁸, Michael Allison⁹, Stephen O'Rahilly^{1,2}, Inês Barroso^{1,2,5}, Thomas Meissner³, Susan Davies¹⁰, Khalid Hussain¹¹, Karen Temple¹², Ana-Coral Barreda-Bonis⁷, Sebastian Kummer³ and Robert K Semple^{1,2}

¹Metabolic Research Laboratories, Wellcome Trust-MRC Institute of Metabolic Science, University of Cambridge, Cambridge, UK,

²The National Institute for Health Research, Cambridge Biomedical Research Centre, Cambridge, UK,

³Department of General Paediatrics, Neonatology and Paediatric Cardiology, University Children's Hospital, Düsseldorf, Germany, ⁴Department of Molecular Genetics, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, UK, ⁵Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, UK, ⁶MRC Epidemiology Unit, University of Cambridge, Cambridge, UK, Departments of ⁷Paediatric Endocrinology and ⁸Clinical and Molecular Genetics, La Paz Hospital, Madrid, Spain, Departments of ⁹Hepatology and ¹⁰Histopathology, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, UK, ¹¹Institute of Child Health, University College London, London, UK, and ¹²Department of Clinical Genetics, University Hospital Southampton, Southampton, UK

Correspondence should be addressed to R K Semple or S Kummer
Email
rks16@cam.ac.uk or
sebastian.kummer@med.uni-duesseldorf.de

Abstract

Objective: Genetic activation of the insulin signal-transducing kinase *AKT2* causes syndromic hypoketotic hypoglycaemia without elevated insulin. Mosaic activating mutations in class 1A phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), upstream from *AKT2* in insulin signalling, are known to cause segmental overgrowth, but the metabolic consequences have not been systematically reported. We assess the metabolic phenotype of 22 patients with mosaic activating mutations affecting PI3K, thereby providing new insight into the metabolic function of this complex node in insulin signal transduction.

Methods: Three patients with megalencephaly, diffuse asymmetric overgrowth, hypoketotic, hypoinsulinaemic hypoglycaemia and no *AKT2* mutation underwent further genetic, clinical and metabolic investigation. Signalling in dermal fibroblasts from one patient and efficacy of the mTOR inhibitor Sirolimus on pathway activation were examined. Finally, the metabolic profile of a cohort of 19 further patients with mosaic activating mutations in PI3K was assessed.

Results: In the first three patients, mosaic mutations in *PIK3CA* (p.Gly118Asp or p.Glu726Lys) or *PIK3R2* (p.Gly373Arg) were found. In different tissue samples available from one patient, the *PIK3CA* p.Glu726Lys mutation was present at burdens from 24% to 42%, with the highest level in the liver. Dermal fibroblasts showed increased basal AKT phosphorylation which was potently suppressed by Sirolimus. Nineteen further patients with mosaic mutations in *PIK3CA* had neither clinical nor biochemical evidence of hypoglycaemia.

Conclusions: Mosaic mutations activating class 1A PI3K cause severe non-ketotic hypoglycaemia in a subset of patients, with the metabolic phenotype presumably related to the extent of mosaicism within the liver. mTOR or PI3K inhibitors offer the prospect for future therapy.

European Journal of
 Endocrinology
 (2017) **177**, 175–186

Introduction

Transient neonatal hypoglycaemia is common, often precipitated by inadequate deposition of energy stores *in utero* and/or perinatal stress. In contrast, persisting hypoglycaemia is often caused by a genetic disorder, and may be insulin dependent or insulin independent (1, 2, 3). The former is usually caused by congenital hyperinsulinism (CHI), or occasionally extreme insulin resistance (4). CHI-related hypoglycaemia features suppressed plasma ketones and free fatty acids but detectable plasma insulin, while glucagon stimulation characteristically increases blood glucose by greater than 30 mg/dL (5). Carbohydrate requirement to maintain euglycaemia in CHI is high, with intravenous glucose infusion rates usually exceeding 8 mg/kg/min in neonates and infants (2). Non-insulin-dependent hypoglycaemia may be caused by inherited metabolic diseases including glycogen storage or fatty acid oxidation disorders (6, 7).

We previously described a syndromic form of hypoglycaemia whose metabolic profile resembles CHI, yet in which neither insulin nor insulin-like molecules can be detected during hypoglycaemia (8). It is caused by the p.Glu17Lys mutation in the kinase *AKT2*, a critical mediator of insulin action (9). This mutation partly uncouples *AKT2* activation from insulin-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) activity by permitting binding of *AKT2* to the PI3K substrate PIP₂ in addition to its product phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP₃) (Fig. 1) (10). This results in low-level cellular responses mimicking the presence of insulin.

Activating mutations in other components of the PI3K/AKT pathway are common in cancer (11, 12), and in isolation, in mosaic form, cause segmental

overgrowth (13, 14, 15). The most commonly mutated gene is *PIK3CA*, encoding the p110 α catalytic subunit of PI3K (13). Mutations in other genes including *PIK3R2*, encoding the p85 β regulatory subunit of PI3K, are also described (16). *PIK3CA*-associated overgrowth in mosaic syndromes is known to affect venous and lymphatic vessels, adipose tissue, bone, muscle and neural tissue. Notably, the timing and site of the mutation gives rise to different patterns within the body, ranging from very specific localised/focal forms to diffuse manifestations involving multiple tissues. Additionally, the strength of genetic activation may further determine the severity of tissue-specific symptoms, resulting in pronounced phenotypic variability of these disorders, potentially also affecting metabolic and/or endocrine tissues. *PIK3R2* mutations lead to Megalencephaly–Polymicrogyria–Polydactyly–Hydrocephalus (MPPH) syndrome, which is predominantly characterised by brain overgrowth and neurological abnormalities; mutations are often germline rather than mosaic. To date, although *PIK3CA* has been proven in numerous genetic and pharmacological studies to be critical for the metabolic effects exerted by insulin, and despite scattered mentions of hypoglycaemia in MCAP (17, 18), the metabolic phenotype has not been examined in detail.

We now describe three patients with early-onset, severe, non-ketotic hypoglycaemia associated with segmental overgrowth and activating mutations in *PIK3CA* or *PIK3R2*, and assess the PI3K pathway dysregulation *in vitro* in patients' fibroblasts. Furthermore, we systematically survey the metabolic profile of a cohort of patients with mosaic PI3K activation ascertained through segmental overgrowth.

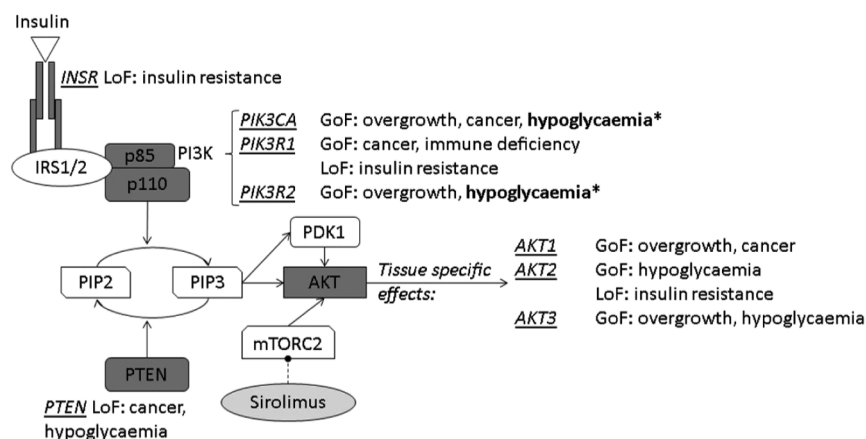


Figure 1

Schematic overview of INSR/PI3K/AKT signalling, showing known monogenic disorders. Asterisks (*) denote mutations described in this report. GoF, gain of function; LoF, loss of function.

Subjects and methods

Cohort studied and ethical approval

Informed consent was obtained from all participants, research was approved by relevant research ethics committees, and the study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. For the cohort analysis, all patients with mosaic activating *PIK3CA* mutations from a study of segmental overgrowth for whom metabolic data were available were also assessed, encompassing volunteers with diagnoses of CLOVES (Congenital lipomatous overgrowth with vascular, epidermal, and skeletal anomalies) syndrome (OMIM #612918) (19), Klippel–Trenaunay (KT) syndrome (OMIM #149000) (20), Fibroadipose hyperplasia (13), macrodactyly or primary muscle overgrowth (21) or Megalencephaly–Capillary Malformation (MCAP) (OMIM #602501) (22). Biochemical evaluations were performed in accredited diagnostic laboratories.

Genetic studies

For Sanger sequencing, exons and flanking regions were PCR amplified before sequencing using ABI's BigDye Terminator Mix, purification using AgenCount AMPure Beads, capillary electrophoresis and analysis using Sequencher software (GeneCodes). Exome-wide sequencing for P1 and parents was performed and analysed as previously described (23). *PIK3CA* p.Glu726Lys mutation burden was determined by custom-designed fluorescence-based restriction fragment assay (as described in Supplementary Online Material, see section on [supplementary data](#) given at the end of this article). P3 salivary DNA was sequenced using a custom panel of overgrowth-related genes on an Illumina MiSeq platform with preceding target enrichment. Further method and details are described in the Supplementary Online Material.

Cellular studies

Dermal fibroblasts were cultured from punch biopsies and maintained in DMEM supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (FBS) containing 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin and 4 mM L-Glutamine (all Sigma). For serum starvation, FBS was substituted by 0.5% Bovine serum albumin (Sigma). For signalling studies, fibroblasts were grown to confluence and washed twice with PBS before serum starvation for 24 h. Sirolimus (Sigma)

was diluted in DMSO to 10 µM. Cells were pre-treated with Sirolimus or DMSO for 48 h prior to continued treatment during serum starvation. Cells were frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C until processing.

AKT phosphorylation was determined using ELISAs for pThr308/309 and pSer473/474 (eBiosciences #85-86044 & #85-86042) according to manufacturer's instructions. Protein quantification was performed by DC Protein assay (BioRad). For immunoblotting, lysates were resolved by electrophoresis on 8% Bis-Tris gels (NuPage, Thermo Fisher) before transfer onto nitrocellulose membranes using the iBlot system (Life Technologies). Membranes were blocked in 4% BSA/TBST prior to primary antibody exposure for 16 h. Following the addition of secondary antibodies, blots were imaged on a BioRad ChemiDoc. The following antibodies were used: anti-calnexin (AbCam #22595), anti-AKT(1/2/3) (CST #9272) and anti-rabbit HRP conjugate (CST #7074). ImageLab software (BioRad) was used to determine band intensity.

Statistical analysis

Statistical analysis was undertaken using GraphPad Prism v.6. Log transformation was performed prior to analysis as the D'Agostino–Pearson test showed non-normal distribution of results. One-way analysis of variance (ANOVA) was undertaken followed by Dunnett's test for comparison of patient against control cells.

Results

Clinical histories

Clinical features of patients 1–3 are summarised in [Table 1](#). Patient 1 (P1) was born at 34 weeks to healthy, non-consanguineous white German parents after polyhydramnios and macrocephaly were noted *in utero*. Her birthweight was 3230 g (+2.0 s.d.), length 52 cm (+1.5 s.d.) and head circumference 37.5 cm (+2.3 s.d.). Generalized muscle hypotonia, hyperaemia of the face, a dorsal haemangioma and dysmorphic features including diastasis recti, syndactyly, short limbs and a 'chubby' appearance were noted at birth ([Fig. 2A and B](#)).

Recurrent hypoglycaemia was observed on day 1. On repeated evaluations, suppressed ketones, undetectable insulin and low free fatty acids were found concomitantly with blood glucose below 2.5 mmol/L. Growth hormone and cortisol rose in response to hypoglycaemia, while plasma amino acids, urinary organic acids and acylcarnitine profile were normal. There was neither

Clinical Study	S M Leiter and others	PI3-kinase associated hypoglycaemia	177:2	178
----------------	-----------------------	-------------------------------------	-------	-----

Table 1 Summary of clinical syndromic features of patients 1–3.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Age (years)	5	2	2
Sex	Female	Male	Male
Birth weight (kg)	3.23 (+2.0 s.d.)	4.340 (+6.8 s.d.)	3.98 (+0.33 s.d.)
Birth length (cm)	52 (+1.5 s.d.)	53 (+1.66 s.d.)	N/A
Head circumference (cm)	37.5 (+2.3 s.d.)	41 (+5.14 s.d.)	N/A
CNS features	Megalencephaly Arnold–Chiari malformation	Megalencephaly Arnold–Chiari malformation Polymicrogyria	Megalencephaly Polymicrogyria
	Hydrocephalus	Hydrocephalus	Hydrocephalus
Seizures	Yes	Yes	Yes
Poly-/syndactyly	Yes	Yes	No
Vascular anomalies	Hyperaemia of face Dorsal haemangioma	Cutis marmorata Lower lip angioma Head and neck lymphatic malformations	No
Developmental delay	Yes, severe	Yes	Yes, severe
Hypotonia	Yes	Yes	Yes
Additional features	Diastasis recti Recurrent infections	Rhizomelia Laryngomalacia Gastroesophageal reflux	Coarse facial appearance

clinical nor biochemical evidence of glycogen storage diseases. Intravenous glucose requirement to maintain euglycaemia in the neonatal period was consistently below 8 mg/kg/min. Fasting tolerance in infancy peaked at 3 h before hypoglycaemia occurred, and management was based on frequent starch-enriched meals. Within the first months of life, poor oral intake led to placement of a percutaneous gastric (PEG) tube.

Diazoxide at up to 7.5 mg/kg/day for 2 weeks at the age of 1 year produced no benefit. Octreotide was tried once (5 µg/kg s.c.), and increased blood glucose from 1.8 to 5.0 mmol/L within 30 min, but was discontinued due to flushing. Glucagon (1 mg s.c.) elicited a modest glucose response during hypoglycaemia (1.9–2.2 mmol/L within 30 min); however, this was at a time of hepatopathy, evidenced by elevated liver transaminases (ALT 99 U/L, AST 183 U/L) and γGT (762 U/L). Liver biopsy, described in detail in Supplementary Online Material, did not reveal any evidence of steatosis or glycogen storage disease, but showed evidence of ductular proliferation without cholestasis or primary duct injury, reminiscent of the response to acute hepatocyte injury ([Supplementary Fig. 1](#)). 20 mg/m²/day methylprednisolone followed by 23 mg/m²/day hydrocortisone slightly improved blood glucose but rapidly increased body weight and reduced growth velocity, leading to cessation after 3 months. Subsequent management was with starch-enriched feeds during the day and PEG feeding with maltodextrin overnight. During nocturnal enteral feeding, glucose requirements were around 2–4 mg/kg/min, between 1 and

5 years of age, and euglycemic clamp studies demonstrated a requirement for 2.4 mg glucose/kg/min to maintain blood glucose between 4.0 and 4.7 mmol/L at the age of 4 years. At 4 years old, she still required continuous overnight feeding, and well-documented episodes of profound nocturnal hypoglycaemia occurred following accidental PEG displacement.

Body length was maintained around –3 s.d. throughout childhood except during glucocorticoid treatment. Body weight was between 0 and +1.3 s.d., with a weight:length ratio above the 97th percentile. Head circumference was between +3.0 and +4.0 s.d. ([Fig. 2C](#)). IGF1 and IGFBP3 were low on repeated evaluations, but growth hormone (GH) response to arginine stimulation testing at the age of 15 months was normal (13.8 µg/L within 30 min). An IGF1 generation test (GH 33 µg/kg s.c. daily for 7 days) only increased IGF1 from 25 to 56 µg/L. Decreased TSH (0.84 mU/L, reference: 0.6–5.5 mU/L) and free T4 (15.7 pmol/L, reference 10–20 pmol/L) were observed at 10 months. 1.8 µg/kg/day levothyroxine normalised fT4, with TSH remaining low.

Additional problems included severe developmental delay and an obstructing Arnold–Chiari malformation requiring ventriculoperitoneal shunting at 5 months. Recurrent airway infections required intensive respiratory support/artificial ventilation; however, no formal assessment for immunodeficiency was undertaken. At the age of 3.7 years, focal seizures independent from hypoglycaemia developed. Levetiracetam was commenced and titrated to 50 mg/kg/day at 5 years, when the patient

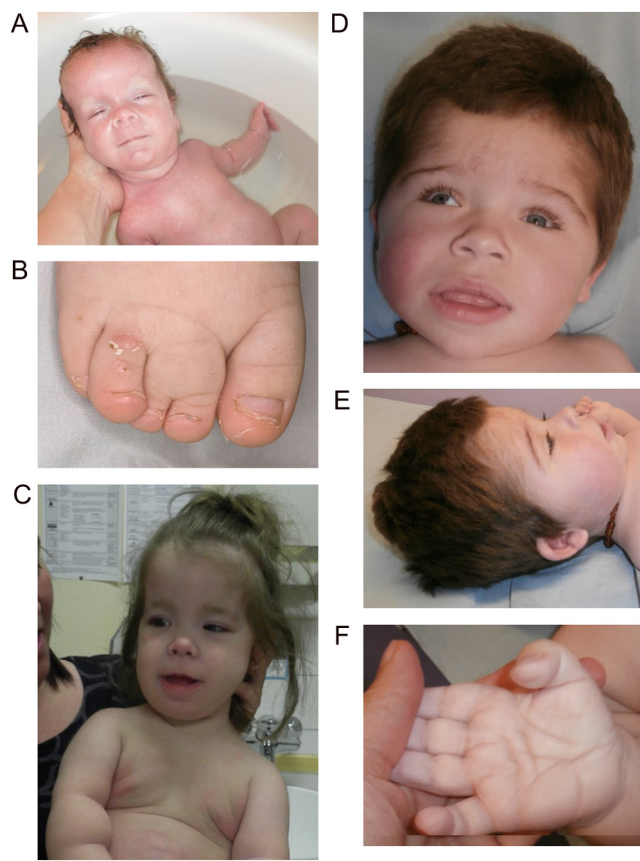


Figure 2

Syndromic features of patients 1 and 3. (A) Image of patient 1 at one month old demonstrating macrocephaly, facial hyperaemia and mildly asymmetric overgrowth. (B) Cutaneous syndactyly between the second and third toe on the right foot of P1. (C) Image of P1 at age 27 months demonstrating macrocephaly, obesity and overgrowth. (D and E) Head and facial features of P3 at 27 months showing macrocephaly, hypertrichosis, coarse facial appearance. (F) Deep palmar creases and excess skin in P3.

died following cardiorespiratory arrest during an upper airway infection. There was no evidence of hypoglycaemia or Arnold–Chiari decompensation. The cause of death remains unknown.

Patient 2 (P2) was born to non-consanguineous white Spanish parents at term after polyhydramnios, and macrocephaly were identified *in utero*. His birthweight was 4340 g (+6.8 s.d.), length 53 cm (+1.66 s.d.) and head circumference 41 cm (+5.14 s.d.). Cutis marmorata, lower lip hemangioma, cutaneous lymphatic malformations and syndactyly in hands and feet were noted at birth. Imaging revealed polymicrogyria, hydrocephalus and an Arnold–Chiari malformation requiring ventriculoperitoneal

shunting at 12 months. Motor development was delayed with marked muscle hypotonia at 10 months. Generalised seizures developed at 1 year, treated with sodium valproate. Liver ultrasonography at 14 months was normal.

Hypoglycaemia was first noted at 4 days and later shown repeatedly to be hypoketotic and hypoinsulinaemic. Free fatty acid and acylcarnitine profiling were normal, and glucagon stimulation demonstrated preserved, mobilisable glycogen stores (Table 2). A reduced GH response to hypoglycaemia was demonstrated at one-month old, accompanied by reduced IGF1 (<25 ng/mL) and IGFBP3 (10th percentile) concentrations. Diazoxide had no beneficial effect, and management was with regular starch-enriched meals and overnight percutaneous feeding. The glucose infusion rate used to maintain euglycaemia was 13 mg/kg/min, but no formal determination of the minimum requirement was undertaken. By 10 months, obesity had developed (weight 11.3 kg (>2.5 s.d.)). At 12 months, percutaneous feeding could be stopped; however, regular carbohydrate-enriched meals continue to be required. Although persistently low plasma IGF1 and IGFBP3 growth velocity were preserved, height remained between the 50th and 75th percentiles at 2.8 years (target height 20th percentile).

Patient 3 (P3) was born to non-consanguineous English parents at 42 weeks gestation following pre-natal diagnosis of hydrocephalus and macrocephaly. His birthweight was 3980 g (+0.33 s.d.). On the first day of life, he had a generalized seizure with undetectable plasma glucose. Because of recurring hypoglycaemia in the first week of life, 13 mg/kg/min intravenous glucose was used to maintain euglycaemia without titration to the lowest dose required. Repeated evaluations over ensuing months showed fasting hypoglycaemia with suppressed ketones, undetectable insulin and low but detectable C peptide levels (Table 2). Short synacthen testing, thyroid function and a genetic screen for congenital hyperinsulinism were normal or negative. Diazoxide was trialled with no discernible benefit, and 4-hourly carbohydrate-enriched feeds were required to maintain euglycaemia.

At 3 months, macrocephaly was noted (head circumference 47 cm (+5.49 s.d.)) with a coarse facial appearance, hypertrichosis and broad digits with soft palms and soles with deep creases and excess skin (Fig. 2D, E and F). Imaging showed hydrocephalus and bilateral presylvian polymicrogyria requiring insertion of a ventriculoperitoneal shunt. A clinical diagnosis of MPPH (OMIM #603387 & #615937) was made. At 2.3 years, weight was 14.7 kg (+1.23 s.d.), height 95.2 cm (+1.72 s.d.) and head circumference 53.6 cm (+3.62 s.d.).

Clinical Study	S M Leiter and others	PI3-kinase associated hypoglycaemia	177:2	180
----------------	-----------------------	-------------------------------------	-------	-----

Table 2 Representative biochemical profiles of patients 1–3.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Reference range
Age	9 months	4 days	15 months	
Glucose (mmol/L)*	2.5	2.7	1.9	3.9–5.5
Insulin (pmol/L)*	Not detectible	Not detectible	Not detectible	<14
C-peptide (nmol/L)*	0.05	0.2	0.227	<0.166**
Urine ketones*	Negative	Negative	Negative	NA
β-Hydroxybutyrate (mmol/L)*	0.024	ND	0.03	>1.8**
Free fatty acids (μmol/L)*	138	'Not elevated'	153	<720**
Cortisol (nmol/L)*	993	464	323	>497
Growth hormone (μg/L)*	7.5	4.7	8.3	>5
Branched chain amino acids	Normal	Normal	Normal	N/A
Glucagon stimulation test [§]	Normal	Normal	Normal	See legend [§]
Glucose infusion rate to maintain euglycaemia (mg/kg/min)	2.4	14 [§]	13 [§]	>8 in CHI in infancy
Triglyceride (mmol/L)	1.1	1.1	1.0	<1.7
IGF1 (ng/mL)	<25	<25	<25	F: 36–170 M: 27–113
IGFBP3 (μg/mL)	0.9	0.94	0.93	0.8–1.9

Values marked with an asterisk (*) were determined during hypoglycaemia, **cut-offs for differentiation between hypoketotic and physiologic/ketotic response to hypoglycaemia. [§]A normal response to glucagon was defined as a rise in plasma glucose rose by at least 1.7 mmol/L following an intramuscular injection of at least 20 μg/kg glucagon. [§]Glucose infusion rates were not titrated to the minimum requirement. CHI, congenital hyperinsulinism; ND, not determined.

Partial seizures are well controlled on phenobarbital, but he is severely intellectually delayed with no speech and inability to sit unaided.

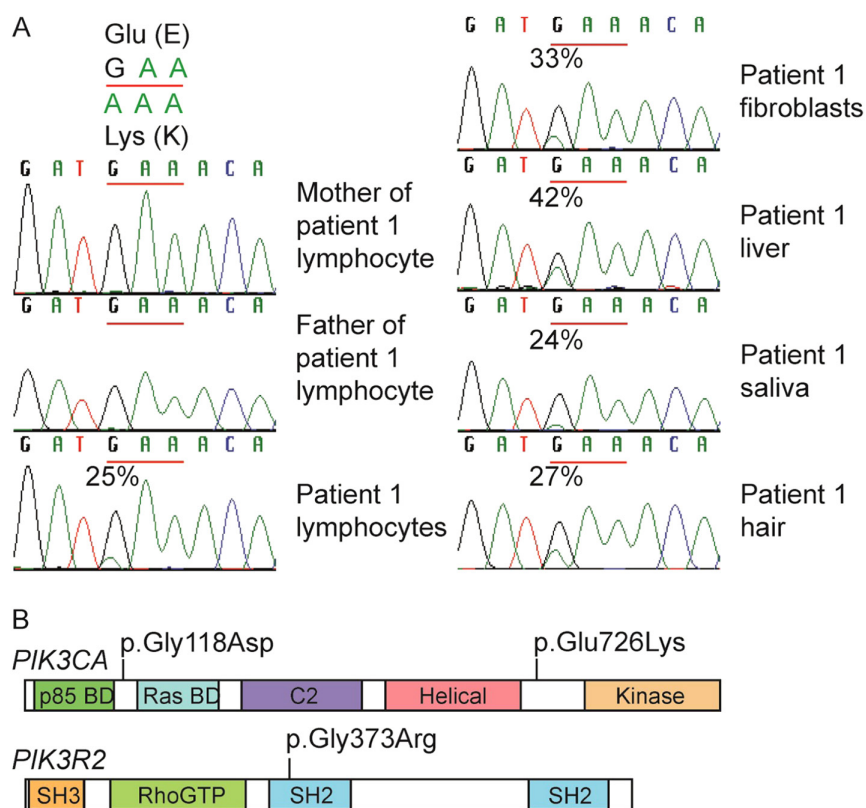
Genetic diagnosis

AKT2 was wild type in lymphocyte DNA from P1, so the patient and parents underwent whole exome sequencing. Five non-synonymous candidate pathogenic variants were identified with a frequency <0.01 in control databases and a posterior probability of *de novo* inheritance >0.8 (Supplementary Table 1) including a single nucleotide substitution (c.2176G>A; p.Glu726Lys) in *PIK3CA* (NM_006218.3), encoding the p110α catalytic subunit of PI3K. This variant was called in 26 of 103 reads, suggesting somatic mosaicism. Sanger sequencing identified the mutation in multiple tissues (Fig. 3A), while restriction fragment length polymorphism assay showed mutation burdens from 24% (saliva) to 42% (liver). Dermal fibroblast DNA from P2 was screened for mutations in *PIK3CA* using Sanger sequencing, revealing the *PIK3CA* c.365G>A mutation (p.Gly118Asp). This was absent from lymphocyte DNA. Both *PIK3CA* mutations have previously been described (OMIM #602501) (16, 24). DNA from a buccal swab of patient P3 was screened for overgrowth-associated mutations using an Illumina MiSeq Panel (Supplementary Online Materials Table 2). A heterozygous c.1117G>A (p.Gly373Arg)

mutation was identified in *PIK3R2* (NM_005027.3), encoding the p85β regulatory subunit of class 1A PI3K. p.Gly373Arg is the most common mutation in *PIK3R2* associated with MPPH type 1 (OMIM #603387) (16). The mutation was identified at a mutation burden of 50%, and this was confirmed independently in a diagnostic laboratory in lymphocyte DNA, also at 50%, consistent with a constitutional mutation. No parental DNA was available for testing. The locations of all 3 mutations in their respective proteins are schematised in Fig. 3B.

Cellular studies

Dermal fibroblasts of P1 were cultured and shown to harbour a mutation burden of 33%, consistent with 66% of the cells carrying a heterozygous mutation at passage 4 (Fig. 3A). They showed a small, significant increase in basal phosphorylation of AKT at Threonine 308/309 and Serine 473/474, as in cells expressing *AKT2* p.Glu17Lys or the overgrowth-related *PIK3CA* p.His1047Leu (Fig. 4A, B and C). By passage 6, this was no longer seen in cells from P1, likely due to progressive decline in mutation burden. Seventy-two hours exposure to Sirolimus, a dual mTORC1/mTORC2 inhibitor, did suppress basal hyperphosphorylation of AKT at Serine 473/474 (the target site of the upstream kinase mTORC2) in early passage cells from another patient carrying the same *PIK3CA* p.Glu726Lys

**Figure 3**

Mutations in PI3K-associated genes in patients 1–3. (A) Sanger sequencing showing *de novo* *PIK3CA* c.2176G>A mutation in patient 1 at 24–42% in all tissues available for DNA testing. (B) Schematic showing locations of the three PI3 kinase mutations associated with hypoglycaemia. p85 BD, p85 binding domain; RBD, Ras binding domain; SH2/3, SRC homology 2/3; BH, breakpoint cluster homologue; P, proline rich domain; PH, Phox homology domain.

mutation (P21) (Fig. 4D), however, or cells expressing *PIK3CA* p.His1047Leu (Fig. 4E).

Metabolic assessment of a wider PI3K-related overgrowth spectrum (PROS) cohort

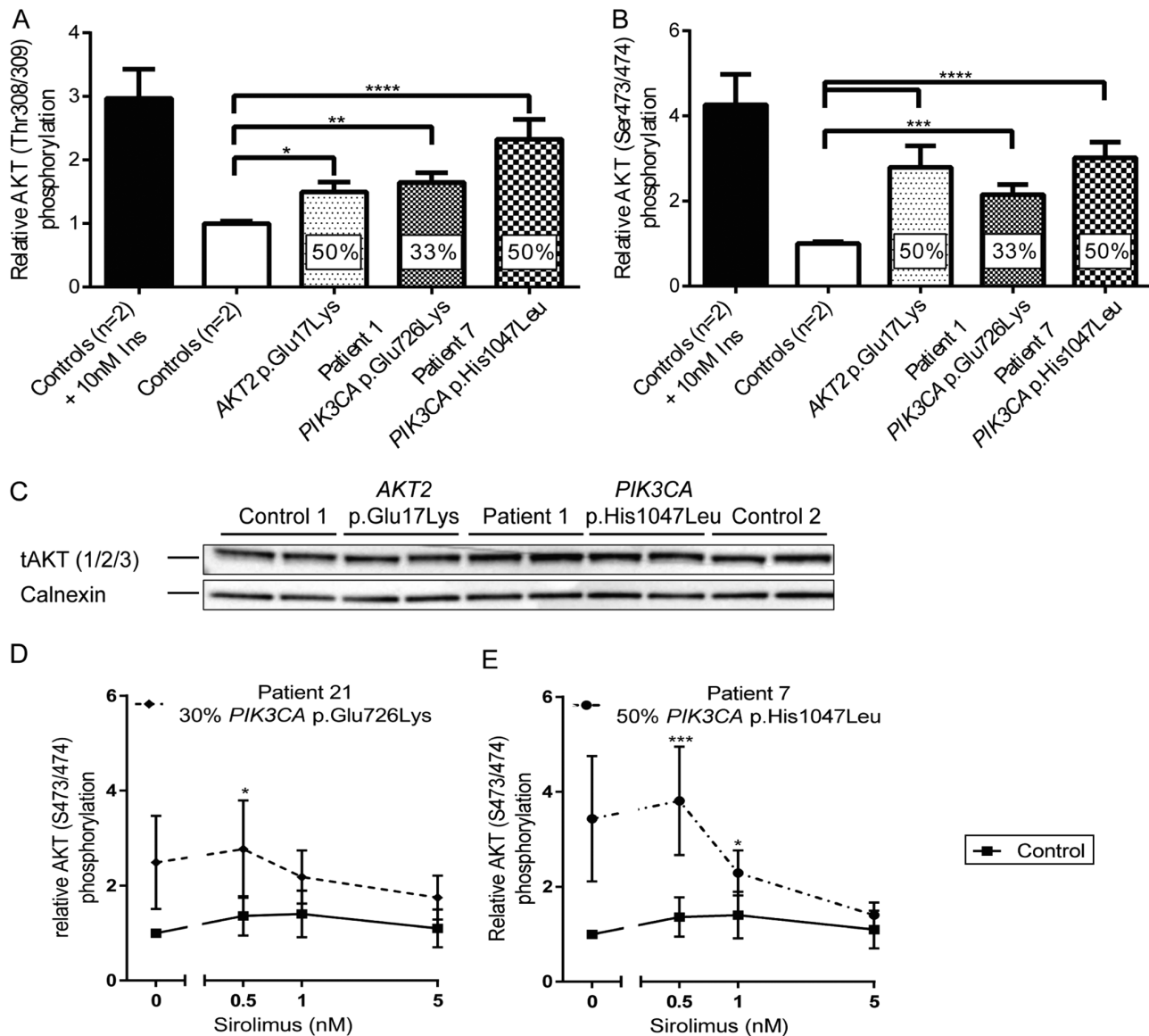
To profile the wider metabolic consequences of mosaic activation of PI3K, a further 19 patients with mosaic activating *PIK3CA* mutations were assessed, as summarised in Table 3. All patients had clinical disorders encompassed by the *PIK3CA*-Related Overgrowth Spectrum (PROS) (15), and were subdivided into those with severe, localized overgrowth and those with more diffuse overgrowth including the brain, similar to patients 1–3. One further patient in this group had the same p.Glu726Lys variant as P1 and one had the p.Gly118Asp variant seen in P2.

None of the PROS patients had fasting hypoglycaemia; however, three patients with MCAP had low or undetectable plasma insulin concentrations with normal or low-normal fasting glucose (P19, P20, P22; Table 3). One of these patients P19 previously had hypoglycaemia during an episode of diarrhoea and vomiting. Five of the eight patients with MCAP, including all three with low fasting insulin levels, had low IGF1 concentrations. Two patients with more extensive overgrowth (P6 and P9) had hyperinsulinemia consistent with insulin resistance.

Oral glucose tolerance tests (OGTT) were completed for thirteen patients, five with MCAP. As shown in Supplementary Fig. 2 and Supplementary Table 3, glucose and insulin were within normal ranges. Finally, given the large pathological expansion of specific adipose depots in many patients with focal severe PROS, and the interest in distinct physiological properties and secreted adipokine profiles of these depots, adipokine levels relative to whole body fat mass were compared between adults in the PROS group and a large control dataset (Supplementary Fig. 3). However, adipokine levels were similar to those in the control population in the large majority of PROS patients including those with extreme focal fat mass (P7, P8), arguing that the adipokine profiles are not distinct in different forms of PROS. Two exceptions were P4, a patient with CLOVES who had a disproportionately high adiponectin concentration, and P20, a patient with CLOVES who had a disproportionately low leptin concentration.

Discussion

'PI3K' here denotes a group of enzymes composed of one of three catalytic subunits (p110 α , β or δ) and one of five regulatory subunits (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β or p55 γ) (25). PI3K generates PIP₃ in response to insulin receptor

**Figure 4**

Signalling downstream from phosphatidylinositol-3-kinase in dermal fibroblasts from patient 1. AKT phosphorylation at Thr308/309 (A) or Ser473/474 (B) was determined by ELISA. Percentages in columns indicate the mutation burden in the cells. Data represent pooled, normalised results from three independent experiments plotted as mean \pm S.E.M. One-way ANOVA and *post hoc* Dunnett's test were used to assess significance. Insulin stimulation is shown for illustration only and was excluded from this statistical analysis. (C) Immunoblotting for total AKT (1/2/3) from samples used for ELISA (A and B). Representative blot from one of three independent replicates. (D and E) AKT Ser473/474 phosphorylation following 72 h of Sirolimus treatment was quantified using ELISA and normalised to AKT expression determined by immunoblotting. (D) dermal fibroblasts from P21; (E) dermal fibroblasts from P7. Results represent mean \pm S.E.M. of three independent replicates. DMSO on its own did not result in a change in phosphorylation (data not shown). Statistical analysis was performed as one experiment and separate graphs are plotted for clarity only. A two-way ANOVA was performed and followed by a *post hoc* Dunnett's test comparing all patients to the same control cell line. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.0001.

Clinical Study	S M Leiter and others	PI3-kinase associated hypoglycaemia	177:2	183
----------------	-----------------------	-------------------------------------	-------	-----

Table 3 Genetic diagnosis and biochemical profile following an overnight fast in patients with PROS.

ID	Sex	Age (years)	Syndrome	Site of overgrowth	B.M.I. (kg/m ²) or *Z-score	Fat mass (%)	PIK3CA mutation	Glucose (mmol/L)	Insulin (pmol/L)	HbA1c (mmol/mol)	Adiponectin (mg/L)	Leptin (µg/L)	IGF1 (ng/mL)
NR								3.9–5.5	0–60	30–48	See legend	See legend	See legend
P4	M	48	CLOVES	L foot	26.7	13	C420R	4	11	40	23.2	ND	76
P5	M	29	CLOVES	L leg and trunk	25.7	23	E545K	4.5	27	34	3.8	5.7	163
P6	M	15	CLOVES	R thorax	–1.6*	19	E542K	6.2	165	ND	17.3	1.8	119
P7	F	37	FAH	Both legs	55	54	H1047L	3.9	13	36	16.9	166	141
P8	F	31	FAH	R arm	32.5	46	H1047L	4.7	ND	ND	ND	ND	221
P9	F	34	FAH	L leg	32.7	47	H1047R	4.7	217	43	1.5	45.5	141
P10	F	9	FAH	L leg	>+3*	29	H1047R	4.8	42	36	ND	ND	122
P11	F	22	MO	Both arms	21.9	32	H1047R	4.7	31	ND	6.3	6.6	242
P12	M	34	KTS	L leg	27.8	38	V346insK	4.3	29	38	ND	16	168
P13	F	40	MD	L hand	32.8	57	H1047R	4.5	73	37	ND	ND	ND
P14	F	39	MD	2 R fingers	25	40	M1043_ N1044delinsLY	4.7	41	33	7.4	13.5	176
P15	F	35	MCAP	Diffuse	34.9	38	G118D	5.1	31	40	5.1	33.3	145
P16	M	29	MCAP	Diffuse	27.1	23	E81K	5.2	31	38	3.9	4.1	158
P17	F	18	MCAP	Diffuse	23.6	43	E81K	5.1	80	35	8.6	31.4	382
P18	F	21	MCAP	Diffuse	43	52	G914R	5.4	51	36	5.1	ND	85
P19	M	1.5	MCAP	Diffuse	ND	ND	R88Q	5.1	<3	48	ND	ND	<25
P20	M	21	MCAP	Diffuse	23.9	44	E726K	3.9	7	ND	6.6	2	28
P21	M	3	MCAP	Diffuse	+1*	43	R93Q	4.3	18	ND	ND	ND	60
P22	M	12	MCAP	Diffuse	ND	ND	D350G	3.9	<14	ND	ND	ND	80

BMI-specific reference ranges for adiponectin in females—<25 kg/m²: 4.4–17.7 mg/mL; 30–35 kg/m²: 2.6–14.9 mg/mL; >35 kg/m²: 2.6–17.1 mg/mL.

Adiponectin reference in males—<25 kg/m²: 2.6–12.6 mg/mL; 25–30 kg/m²: 2.4–10.6 mg/mL. BMI-specific reference ranges for leptin in females—<25 kg/m²: 2.4–24.4 ng/mL; 25–30 kg/m²: 8.6–38.9 ng/mL; >35 kg/m²: 22.7–113.6 ng/mL. Leptin reference in males—<25 kg/m²: 0.4–8.3 ng/mL; 25–30 kg/m²: 1.5–13.0 ng/mL. Age-specific IGF-1 reference ranges in females—9–11 years: 87–396 ng/mL; 16–20 years: 266–467 ng/mL; 21–24 years: 148–330 ng/mL; 25–40 years: 123–304 ng/mL. IGF-1 reference ranges in males—2–60 months: 27–113 ng/mL; 12–15 years: 115–495 ng/mL; 21–24 years: 186–397 ng/mL; 25–40 years: 124–300 ng/mL; 41–50 years: 89–239 ng/mL.

CLOVES, congenital lipomatous overgrowth with vascular, epidermal and skeletal anomalies; FAH, fibroadipose hyperplasia; KTS, Klippel-Trenaunay syndrome; MCAP, macrocephaly and capillary malformation syndrome; MD, macrodactyly; MO, muscle overgrowth; ND, not determined; NR, normal range.

activation, leading in turn to AKT/PKB activation. Genetic and pharmacological evidence has established that the catalytic p110 α subunit, encoded by *PIK3CA*, is critical for the glucose-lowering by insulin, while AKT2 is the 'metabolic AKT isoform' (26). The only example to date of hypoketotic hypoglycaemia due to a mutation activating insulin signalling is a *de novo* activating mutation in *AKT2* (27) that has been described in five patients. Activation of other components of this pathway, such as PI3K, would be anticipated to cause a similar metabolic profile; however, given the pleiotropic growth-promoting actions of PI3K, the associated syndrome would be expected to be more complex. Mosaic genetic activation of PI3K has recently been described in a wide range of segmental overgrowth disorders with overlapping features (13, 28). Seven patients with *PIK3CA* mutations, overgrowth and infantile hypoglycaemia were described while this work was underway (18), but no further metabolic characterisation was undertaken.

We describe three patients with megalencephalic PI3K-related overgrowth who had severe, likely non-insulin-dependent hypoketotic hypoglycaemia, similar to that caused by activating *AKT2* mutations, persisting to at least 2 years old in all cases. This affected only a subset of patients with PI3K-related overgrowth, likely due to the predominantly mosaic nature of the condition. This mosaicism, with only some cells and tissues affected, complicates efforts to distinguish among several possible mechanisms underlying hypoglycaemia. The simplest explanation is that tonic activity of hepatic PI3K leads to inappropriate suppression of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in the postabsorptive state. Most of the liver would have to be affected to exert a significant effect. A liver biopsy from P1 presented the opportunity to examine liver in one patient with *PIK3CA*-related hypoglycaemia. It showed a mutation burden of 42%, corresponding to 84% of cells bearing a heterozygous mutation; however, neither glycogenosis nor steatosis

Clinical Study	S M Leiter and others	PI3-kinase associated hypoglycaemia	177:2	184
----------------	-----------------------	-------------------------------------	-------	-----

were seen, while prominent ductular reaction without cholestasis or primary duct injury was reminiscent of the response to severe and acute hepatocyte injury (29). Without knowing which cells harboured the *PIK3CA* mutation, no more precise correlation was possible between the abnormal histology and the mutation. If liver-autonomous failure to derepress glycogenolysis/gluconeogenesis were the major abnormality explaining PROS-related hypoglycaemia, then only a small glucose requirement to maintain euglycaemia would be expected, as reported for patients with activating *AKT2* mutations. (27) This was confirmed for P1 in this report; however, infusion rates in P2 and P3 were reported to be high. Whether glucose infusions were titrated to the lowest possible rate to maintain euglycaemia was unclear, however.

PI3K-related hypoglycaemia may alternatively reflect suppression of adipose lipolysis, which provides energy and gluconeogenic substrates to fasting hepatocytes (30, 31). This was shown by the lack of an adequate rise of free fatty acids in P1 during hypoglycaemia (Table 2). Fasting free fatty acid levels in the PROS cohort were not studied; however, in two patients with genetic *AKT2* activation, we observed correlation of free fatty acid suppression with fasting hypoglycaemia (32). Although increased PI3K-mediated, GLUT4-dependent glucose uptake into skeletal muscle and adipose tissue could also cause hypoglycaemia, patients with severe local adipose or muscle overgrowth due to strongly activating *PIK3CA* mutations, but with no liver involvement, exhibited neither spontaneous hypoglycaemia nor hypoinsulinaemia. This argues that regional adipose tissue or muscle PI3K-mediated glucose uptake either does not occur, or is insufficient to produce hypoglycaemia.

Finally, aberrant activity of PI3K in the brain may also play a role: low IGF1 levels in 63% of the MCAP patients suggest dysfunctional GH secretion or action. This may reflect tonically active PI3K in the hypothalamus and/or the pituitary, mimicking IGF1 action and erroneously activating negative feedback inhibition of GH-releasing hormone or GH release. In contrast, stimulation of GH secretion on provocative testing may yield normal results, as shown in P1, suggesting that suppressed basal secretion may be overridden. The central hypothyroidism in P2, and in three previously described MCAP patients (18), and the modest GH and cortisol responses to hypoglycaemia suggest that hypothalamic-pituitary function may show wider perturbation. Attenuated neuroendocrine counterregulatory responses to hypoglycaemia are a

plausible explanation for the GH and cortisol responses; however, this cannot be proven, and studies of further affected patients will be required to elucidate whether abnormality of regulation, a subtle developmental disorder of the hypothalamus/pituitary or both are seen in MCAP caused by PI3K activation. Evidence that different adipose depots show distinct profiles of adipokine secretion (33, 34) raised the possibility that pathological expansion of only some adipose depots (e.g. legs vs upper body) would correspond to a distinct pattern of circulating adipokines. In general, we found this not to be the case, with the large majority of patients showing a similar relationship between adipokine concentrations and whole body adipose tissue mass to that seen in the general population. Two outliers were found with perturbed adiponectin or leptin levels; however, the explanation was not immediately clear, and wider investigation may be warranted.

Importantly, our findings suggest that mTOR inhibitors such as Sirolimus may have therapeutic benefit instead of, or in addition to, nutritional therapies including percutaneous overnight feeding. Although Sirolimus is primarily an mTORC1 inhibitor, prolonged use sequesters components of the mTORC2 complex (35), which acts upstream from AKT in insulin signalling. Our findings suggest that Sirolimus at very low doses (1.1–2.2 ng/mL) may be sufficient, unlike the high doses used in hyperinsulinism (5–15 ng/mL) (36). In future, low doses of more specific class 1A PI3K inhibitors, many examples of which are in clinical trials for cancer, may offer a more specific targeted therapy.

In conclusion, we report that a subset of patients with diffuse, megalencephalic forms of *PIK3CA*-related segmental overgrowth and MPPH exhibit severe insulin-independent hypoketotic hypoglycaemia. This metabolic phenocopy of hypoglycaemia driven by genetic *AKT2* activation is not seen in patients with extreme regional adipose or muscular overgrowth associated with 'hot spot' activating *PIK3CA* mutations, suggesting that diffuse mutation carriage is more important than the degree of PI3K activation in determining the phenotype. We suggest that endocrinologists should be alert to the possibility of syndromic PI3K-related overgrowth when evaluating infants with hypoinsulinaemic hypoketotic hypoglycaemia, or with equivocal biochemical testing for congenital hyperinsulinism, and that they should understand the challenges of testing for a mosaic genetic disorder. Prior knowledge and our cellular studies suggest that mTOR inhibitors may offer therapeutic benefit, and are worthy of clinical study.

Supplementary data

This is linked to the online version of the paper at <http://dx.doi.org/10.1530/EJE-17-0132>.

Declaration of interest

I B would like to disclose ownership of stock in GlaxoSmithKline, and Incyte and R K S would like to disclose receipt of speaker fees from Novo Nordisk and Sandoz.

Funding

This work was supported by the Wellcome Trust (grant number WT098498); the Medical Research Council (MRC_MC_UU_12012/5); the United Kingdom National Institute for Health Research (NIHR) Cambridge Biomedical Research Centre; the Rosetrees Trust (M223); and the EU/EFPIA Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking (EMIF grant no 115372).

References

- James C, Kapoor RR, Ismail D & Hussain K. The genetic basis of congenital hyperinsulinism. *Journal of Medical Genetics* 2009 **46** 289–299. (doi:10.1136/jmg.2008.064337)
- Hussain K. Congenital hyperinsulinism. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2005 **10** 369–376. (doi:10.1016/j.siny.2005.03.001)
- Straussman S & Levitsky LL. Neonatal hypoglycemia. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 2010 **17** 20–24. (doi:10.1097/MED.0b013e328334f061)
- Semple RK, Williams RM & Dunger DB. What is the best management strategy for patients with severe insulin resistance? *Clinical Endocrinology* 2010 **73** 286–290. (doi:10.1111/j.1365-2265.2010.03810.x)
- Ferrara C, Patel P, Becker S, Stanley CA & Kelly A. Biomarkers of insulin for the diagnosis of hyperinsulinemic hypoglycemia in infants and children. *Journal of Pediatrics* 2016 **168** 212–219. (doi:10.1016/j.jpeds.2015.09.045)
- Bennett MJ. Pathophysiology of fatty acid oxidation disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2009 **33** 533–537. (doi:10.1007/s10545-010-9170-y)
- Wolfsdorf JI & Weinstein DA. Glycogen storage diseases. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2003 **4** 95–102. (doi:10.1023/A:1021831621210)
- Hussain K, Challis B, Rocha N, Payne F, Minic M, Thompson A, Daly A, Scott C, Harris J, Smillie BJL *et al.* An activating mutation of AKT2 and human hypoglycemia – supporting online materials. *Science* 2011 **334** 1–11. (doi:10.1126/science.1210878)
- Schultze SM, Hemmings BA, Tschopp O & Niessen M. Promiscuous affairs of PKB/AKT isoforms in metabolism. *Archives of Physiology and Biochemistry* 2011 **117** 70–77. (doi:10.3109/13813455.2010.539236)
- Landgraf KE, Pilling C & Falke JJ. Molecular mechanism of an oncogenic mutation that alters membrane targeting: Glu17Lys modifies the PIP lipid specificity of the AKT1 PH domain. *Biochemistry* 2008 **47** 12260–12269. (doi:10.1021/bi801683k)
- Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ *et al.* High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004 **304** 554. (doi:10.1126/science.1096502)
- Samuels Y & Waldman T. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol 347 pp 21–41. 2011. Berlin: Springer-Verlag. (doi:10.1007/978-3-642-14816-3)
- Lindhurst MJ, Parker VER, Payne F, Sapp JC, Rudge S, Harris J, Witkowski AM, Zhang Q, Groeneveld MP, Scott CE *et al.* Mosaic overgrowth with fibroadipose hyperplasia is caused by somatic activating mutations in PIK3CA. *Nature Genetics* 2012 **44** 928–933. (doi:10.1038/ng.2332)
- Kurek KC, Luks VL, Ayturk UM, Alomari AI, Fishman SJ, Spencer SA, Mulliken JB, Bowen ME, Yamamoto GL, Kozakewich HPW *et al.* Somatic mosaic activating mutations in PIK3CA cause CLOVES syndrome. *American Journal of Human Genetics* 2012 **90** 1108–1115. (doi:10.1016/j.ajhg.2012.05.006)
- Keppeler-Noreuil KM, Rios JJ, Parker VER, Semple RK, Lindhurst MJ, Sapp JC, Alomari A, Ezaki M, Dobyns W & Biesecker LG. PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): Diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2015 **167** 287–295. (doi:10.1002/ajmg.a.36836)
- Rivière JB, Mirzaa GM, O'Roak BJ, Beddaoui M, Alcantara D, Conway RL, St-Onge J, Schwartzentruber JA, Gripp KW, Nikkel SM *et al.* De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes – supplementary information. *Nature Genetics* 2012 **44** 934–940. (doi:10.1038/ng.2331)
- Nellist M, Schot R, Hoogeveen-Westerveld M, Neuteboom RF, Louw EJTM van der, Lequin MH, Bindels-de Heus K, Sibbles BJ, Coor de, Brooks A *et al.* Germline activating AKT3 mutation associated with megalencephaly, polymicrogyria, epilepsy and hypoglycemia. *Molecular Genetics and Metabolism* 2015 **114** 467–473. (doi:10.1016/j.ymgme.2014.11.018)
- Mirzaa G, Timms AE, Conti V, Boyle EA, Girisha KM, Martin B, Kircher M, Olds C, Juusola J, Collins S *et al.* PIK3CA-associated developmental disorders exhibit distinct classes of mutations with variable expression and tissue distribution. *JCI Insight* 2016 **1** 1–18. (doi:10.1172/jci.insight.87623)
- Sapp JC, Turner JT, Kamp JM van de, Dijk FS van, Lowry RB & Biesecker LG. Newly delineated syndrome of congenital lipomatous overgrowth, vascular malformations, and epidermal nevi (CLOVE syndrome) in seven patients. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2007 **143A** 2944–2958. (doi:10.1002/ajmg.a.32023)
- Oduber CEU, Horst CMAM van der & Hennekam RCM. Klippel-Trenaunay syndrome: diagnostic criteria and hypothesis on etiology. *Annals of Plastic Surgery* 2008 **60** 217–223. (doi:10.1097/SAP.0b013e318062abc1)
- Rasmussen M, Sunde L, Weigert KP, Bogaard PW & Lildballe DL. Segmental overgrowth syndrome due to an activating PIK3CA mutation identified in affected muscle tissue by exome sequencing. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2014 **164** 1318–1321. (doi:10.1002/ajmg.a.36454)
- Mirzaa GM, Rivière JB & Dobyns WB. Megalencephaly syndromes and activating mutations in the PI3K-AKT pathway: MPPH and MCAP. *American Journal of Medical Genetics: Part C, Seminars in Medical Genetics* 2013 **163C** 122–130. (doi:10.1002/ajmg.c.31361)
- Walter K, Min JL, Huang J, Crooks L, Memari Y, McCarthy S, Perry JRB, Xu C, Futema M, Lawson D *et al.* The UK10K project identifies rare variants in health and disease – supplementary information. *Nature* 2015 **526** 82–90. (doi:10.1038/nature14962)
- Limaye N, Kangas J, Mendola A, Godfraind C, Schlögel MJ, Helaers R, Eklund L, Boon LM & Viskula M. Somatic activating PIK3CA mutations cause venous malformation. *American Journal of Human Genetics* 2015 **97** 914–921. (doi:10.1016/j.ajhg.2015.11.011)
- Funaki M, Katagiri H, Inukai K, Kikuchi M & Asano T. Structure and function of phosphatidylinositol-3,4 kinase. *Cellular Signalling* 2000 **12** 135–142. (doi:10.1016/S0898-6568(99)00086-8)
- Taniguchi CM, Kondo T, Sajan M, Luo J, Bronson R, Asano T, Farese R, Cantley LC & Kahn CR. Divergent regulation of hepatic glucose and lipid metabolism by phosphoinositide 3-kinase via Akt and PKC λ /zeta. *Cell Metabolism* 2006 **3** 343–353. (doi:10.1016/j.cmet.2006.04.005)
- Hussain K, Challis B, Rocha N, Payne F, Minic M, Thompson A, Daly A, Scott C, Harris J, Smillie BJL *et al.* An activating mutation

Clinical Study	S M Leiter and others	PI3-kinase associated hypoglycaemia	177:2	186
----------------	-----------------------	-------------------------------------	-------	-----

- of AKT2 and human hypoglycemia. *Science* 2011 **334** 2011. (doi:10.1126/science.1210878)
- 28 Vahidnezhad H, Youssefian L, Baghdadi T, Sotoudeh S, Tavassoli A, Zeinali S, Afsharaalam S & Uitto J. Phenotypic heterogeneity in PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum (PROS). *British Journal of Dermatology* 2016 **175** 810–814. (doi:10.1111/bjd.14618)
 - 29 Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, Brunt EM, Crawford JM, Crosby HA, Desmet V *et al.* Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* 2004 **39** 1739–1745. (doi:10.1002/hep.20130)
 - 30 Titchenell PM, Quinn WJ, Lu M, Chu Q, Lu W, Li C, Chen H, Monks BR, Chen J, Rabinowitz JD *et al.* Direct hepatocyte insulin signaling is required for lipogenesis but is dispensable for the suppression of glucose production. *Cell Metabolism* 2016 **23** 1154–1166. (doi:10.1016/j.cmet.2016.04.022)
 - 31 Titchenell PM, Chu Q, Monks BR & Birnbaum MJ. Hepatic insulin signalling is dispensable for suppression of glucose output by insulin in vivo. *Nature Communications* 2015 **6** 7078. (doi:10.1038/ncomms8078)
 - 32 Minic M, Rocha N, Harris J, Groeneveld MP, Leiter S, Wareham N, Sleight A, De Lonlay P, Hussain K, O'Rahilly S & Semple RK. Constitutive activation of AKT2 in humans leads to hypoglycemia without fatty liver or metabolic dyslipidemia. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2017 [Epub ahead of print]. (doi:10.1210/jc.2017-00768)
 - 33 Martin ML & Jensen MD. Effects of body fat distribution on regional lipolysis in obesity. *Journal of Clinical Investigation* 1991 **88** 609–613. (doi:10.1172/JCI115345)
 - 34 Buemann B, Sørensen TIA, Pedersen O, Black E, Holst C, Toubro S, Echwald S, Holst JJ, Rasmussen C & Astrup A. Lower-body fat mass as an independent marker of insulin sensitivity – the role of adiponectin. *International Journal of Obesity (2005)* 2005 **29** 624–631. (doi:10.1038/sj.ijo.0802929)
 - 35 Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL & Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell* 2006 **22** 159–168. (doi:10.1016/j.molcel.2006.03.029)
 - 36 Senniappan S, Alexandrescu S, Tatevian N, Shah P, Arya V, Flanagan S, Ellard S, Rampling D, Ashworth M, Brown RE *et al.* Sirolimus therapy in infants with severe hyperinsulinemic hypoglycemia. *New England Journal of Medicine* 2014 **370** 1131–1137. (doi:10.1056/NEJMoa1310967)

Received 15 February 2017

Revised version received 16 May 2017

Accepted 30 May 2017

CLAPO syndrome: identification of somatic activating *PIK3CA* mutations and delineation of the natural history and phenotype

Lara Rodriguez-Laguna, BSc, MSc^{1,9}, Kristina Ibañez, PhD^{2,9}, Gema Gordo, BSc, MSc^{1,3}, Sixto Garcia-Minaur, MD, PhD^{3,4}, Fernando Santos-Simarro, MD^{3,4}, Noelia Agra, BSc, PhD¹, Elena Vallespín, BSc, PhD^{3,5}, Victoria E Fernández-Montaño, HNC⁵, Rubén Martín-Arenas, HNC⁵, Ángela del Pozo, PhD², Héctor González-Pecellín, HNC⁵, Rocío Mena, BSc, PhD^{3,5}, Inmaculada Rueda-Arenas, HNC⁵, María V. Gomez, HNC⁵, Cristina Villaverde, HNC^{3,6}, Ana Bustamante, BSc, PhD^{3,6}, Carmen Ayuso, MD, PhD^{3,6}, Víctor L. Ruiz-Perez, BSc, PhD^{3,7}, Julián Nevado, BSc, PhD^{3,5}, Pablo Lapunzina, MD, PhD^{3,4}, Juan C. Lopez-Gutierrez, MD, PhD^{8,9} and Victor Martinez-Glez, MD, PhD^{1,3,9}

Purpose: CLAPO syndrome is a rare vascular disorder characterized by capillary malformation of the lower lip, lymphatic malformation predominant on the face and neck, asymmetry, and partial/generalized overgrowth. Here we tested the hypothesis that, although the genetic cause is not known, the tissue distribution of the clinical manifestations in CLAPO seems to follow a pattern of somatic mosaicism.

Methods: We clinically evaluated a cohort of 13 patients with CLAPO and screened 20 DNA blood/tissue samples from 9 patients using high-throughput, deep sequencing.

Results: We identified five activating mutations in the *PIK3CA*

gene in affected tissues from 6 of the 9 patients studied; one of the variants (NM_006218.2:c.248T>C; p.Phe83Ser) has not been previously described in developmental disorders.

Conclusion: We describe for the first time the presence of somatic activating *PIK3CA* mutations in patients with CLAPO. We also report an update of the phenotype and natural history of the syndrome.

Genet Med advance online publication 15 February 2018

Key Words: CLAPO; overgrowth; *PIK3CA*; somatic mosaicism; vascular malformation

INTRODUCTION

Vascular anomalies represent a broad spectrum of disorders produced by abnormal embryological development of blood vessels. The manifestations of these disorders may be prenatal, congenital, or postnatal. In general, they manifest with a gradual increase in size or extent, proportionally greater than the growth of the patient.¹ Vascular anomalies frequently occur as part of recognizable, pleiotropic developmental syndromes,² which include overgrowth syndromes.³

CLAPO syndrome (OMIM 613089)—capillary malformation of the lower lip, lymphatic malformation of the face and neck, asymmetry and partial/generalized overgrowth—is a rare vascular disorder of unknown etiology first described in 2008 in six unrelated patients.⁴ Only two additional patients have been described.^{5,6} The tissue distribution of the clinical

manifestations in patients with CLAPO is similar to other vascular and overgrowth syndromes caused by somatic mutations such as Proteus syndrome caused by activating mutations in *AKT1*,⁷ Sturge–Weber syndrome caused by activating mutations in *GNAQ*,⁸ or PROS (*PIK3CA* related overgrowth spectrum) caused by activating mutations in *PIK3CA*.⁹

Somatic mosaicism is defined as the presence of more than one clone of cells with different genotypes, all of which are derived from a single cell. Mosaicism can contribute to variable clinical expressivity of a trait due to tissue-specific involvement. Consequently, the phenotypic spectrum of all these vascular and/or segmental overgrowth syndromes is heterogeneous and complex. Somatic mosaicism is a theoretical possibility in CLAPO, and even though it is a clinically

¹Vascular Malformations Section, Institute of Medical and Molecular Genetics, INGEMM-IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; ²Bioinformatics Section, Institute of Medical and Molecular Genetics, INGEMM-IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; ³CIBERER, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, ISCIII, Madrid, Spain; ⁴Clinical Genetics Section, Institute of Medical and Molecular Genetics, INGEMM-IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; ⁵Structural and Functional Genomics Section, Institute of Medical and Molecular Genetics, INGEMM-IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; ⁶Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols,” CSIC-UAM, Madrid, Spain; ⁷Department of Genetics, IIS-Fundación Jiménez Díaz UAM, Madrid, Spain; ⁸Vascular Anomalies Center, Plastic Surgery, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain. Correspondence: Juan Carlos López-Gutiérrez or Victor Martínez-Glez (queminfantil.hulp@salud.madrid.org or vmartineglez@salud.madrid.org)

⁹The first two and the last two authors contributed equally to this work.

Submitted 29 September 2017; accepted 29 September 2017; advance online publication 15 February 2018. doi:10.1038/gim.2017.200

well-distinguished syndrome, it shares several clinical manifestations with previously mentioned syndromes as well as with other entities also caused by mutations in genes within the PI3K-Akt-mTOR pathway. Here we tested the hypothesis that CLAPO could be caused by somatic mutations activating this pathway, and we evaluated the natural history and phenotype of CLAPO and its phenotypic overlap with other PI3K-Akt-mTOR entities.

MATERIALS AND METHODS

Patients and samples

The study was performed at the Institute of Medical and Molecular Genetics and the Vascular Anomalies Center at La Paz Hospital, Madrid (Spain). We retrospectively reviewed the clinical characteristics and follow-up of 13 patients diagnosed with CLAPO between February 2007 and March 2017, including the 6 patients reported in the original description of the syndrome.⁴ Clinical findings are summarized in **Table 1**.

Blood samples were collected from all patients, saliva samples from four patients and affected tissue samples from nine patients (**Table 1**). Affected tissue was defined as any type of vascular malformation obtained as part of the routine treatment, and in the case of cutaneous biopsies, these were obtained in regions with vascular malformation and/or true overgrowth (differentiating it from an asymmetry as a consequence of a vascular malformation). DNA extraction was performed by standard procedures. All studies in this project were approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitario La Paz (PI-1919), with informed consent including consent to publish patient photos.

High-throughput sequencing

High-throughput sequencing studies were performed using three distinct custom panels previously available and validated for use in our laboratory. The subsequent analyses of the sequencing data were based on the use of virtual panels (i.e., tiers) with an average expected reading depth of 500×. The first panel (Tier1: Mosaic panel) included 20 genes known to cause developmental syndromes in the form of somatic mosaicism. The second panel (Tier2: overgrowth, lymphatic and vascular syndromes (OGLYVAS) panel) was composed of 301 genes associated with lymphatic/vascular malformations and overgrowths of vascular origin, including PI3K-Akt-mTOR pathway genes, as well as 20 genes of the Mosaic panel. The third panel (Tier3: expanded mosaic candidate genes (EMG)) included 1,375 genes, including genes in the OGLYVAS panel. The complete lists of genes can be found in **Supplementary Table 1** online.

The three panels were designed, captured, and analyzed with the same tools, protocols, and instruments. The custom panels were designed by using NimbleDesign software (Roche NimbleGen, WI, USA): hg19 NCBI Build 37.1/GRCh37.p13, targeting >98% of all exons (RefSeq) for these genes. For each sample, paired-end (2 × 150 bp reads) libraries were created according to the standard protocols KAPA HTP Library

Preparation Kit for Illumina platforms (Roche Sequencing, CA, USA), SeqCap EZ Library SR (Roche NimbleGen, WI, USA) and NEXTflex-96 Pre Capture Combo Kit (Bioo Scientific, TX, USA) for indexing. The captured DNA samples were sequenced on a NextSeq 500 instrument (Illumina, CA, USA) using a HIGH v2 300 cycles cartridge, according to the standard operating protocol.

Bioinformatics analysis pipeline

Data generated by the NextSeq 500 Desktop Sequencer was analyzed using an in-house bioinformatics pipeline for somatic mosaicism detection. BCL files containing base calls were converted into paired FASTQ files using bcl2fastq-v2.15.0.4 software from Illumina (<https://github.com/brwnj/bcl2fastq>) and preprocessing using Trimmomatic¹⁰ for trimming and cropping FASTQ data as well as removing adapters. Subsequently, balanced reads were mapped to hg19/GRCh37 human genome by using Bowtie2 aligner,¹¹ and polymerase chain reaction (PCR) duplicate reads were removed using Picard MarkDuplicates (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). A subsequent local realignment and recalibration of reads was done to correct misalignments due to the presence of indels by using Genome Analysis Toolkit RealignerTargetCreator and IndelRealigner, and BaseRecalibrator methods, respectively. Once this preprocessing was achieved, the flowchart depicted in **Supplementary Figure 1** was followed.

The specific approach for mosaic detection included the extraction of the base-pair information for each genomic position from the BAM files using SAMtools mpileup v1.3 (ref. 12), facilitating the subsequent single-nucleotide polymorphism/indel calling. The base quality (q value) and mapping quality scores (Q value) were lowered to 0, to characterize mutated alleles amplified in very low proportion and to avoid losing variants in non-unique genomic sequences, since many genes in the capture design have pseudogenes or share high percent identity with other genomic sites.

Variant calling was performed using bcftools v1.3. The low constraints allowed the emergence of many alternate alleles, even though many could be false positives. The strategy of the analysis was to keep all multiallelic sites in the VCF file for later consideration. Some attributes were defined to filter out likely sequencing artifacts or variants with high frequency in samples sequenced in the same run, and others to keep mosaic variants to analyze further on. This was applied in all the samples individually, regardless of the tissue type, generating a corresponding VCF file (see **Supplementary Figure 1a**).

Subsequently, a germ-line versus somatic variant comparison was undertaken by analyzing the tissue and the blood VCF files from the same patient/sample (see **Supplementary Figure 1b**). The contrasting of matched tissue and blood samples was crucial to distinguish somatic from germ-line variants, bringing out low allelic fraction from background noise caused by the high-throughput sequencing error rate.

Table 1 Phenotypic review of 13 patients with CLAPO

ID	Age ^a	Sex	Years of follow-up	Biological samples	<i>PIK3CA</i> mutation detected	CM lower lip (HPO:0005306)	LM (HPO:0100766)	Overgrowth (HPO:0001548)	VM (HPO:0012721)	Other CM	Other
P1	40	Male	10.2	Blood and affected skin tissue	+	Full lip	Bilateral lymphedema with predominance of foot-knee	Partial overgrowth of the right side of the body (+1.5 cm.)	Multiple varicose veins in the legs	Right area of the body, reddish color	—
P2	17	Female	10.2	Blood and affected skin tissue	+	2 cm	Lower limbs	Left leg and right arm hypertrophy	—	Left inguinal region	—
P3	20	Male	9.4	Blood	N/S	Full lip	Tongue and mandibular region	Generalized	Neck	—	—
P4	20	Female	10.1	Blood and LM tissue	—	Full lip	Tongue and mandibular region	—	Neck	—	Pectus excavatum
P5	16	Female	10.0	Blood	N/S	4 cm	Tongue and mandibular region	—	Neck	—	—
P6	11	Female	10.2	Blood and LM tissue	+	2 cm	Tongue and mandibular region	—	Neck	Neck	—
P7	18	Female	2.6	Blood, CM tissue, and saliva	—	Full lip	Intraoral part of the lip	—	—	—	Multiple small melanocytic nevi in clavicle, back, and lumbar region
P8	12	Male	2.0	Blood and affected mucosa tissue	—	3 cm	Cervicofacial region, tongue, gluteus	—	Neck	Right gluteus	Left facial paralysis and hypotonia
P9	4	Female	1.5	Blood and CM tissue	+	3 cm	—	—	Neck	Multiple, extensive: right lower limb (genital and gluteal), face, neck	Presacral ganglioneuroma.
P10	2	Female	1.5	Blood, CM tissue and saliva	+	Full lip	Cervicofacial region, tongue	Segmental hypoplasia	Neck	Left hand, between the 4th and 5th fingers	Noneffective rapamycin treatment; ocular impairment due to LM; gastrectomy
P11	5	Male	1.1	Blood and saliva	N/S	Full lip	Cervicofacial region	—	Neck	Glabella and neck	—
P12	4	Male	1.1	Blood and saliva	N/S	Full lip	Cervicofacial region, tongue	—	Neck	Tongue and right ankle	—
P13	7	Female	0.8	Blood and LM tissue	+	Gingiva, no lip involvement	Tongue and mandibular region	—	Tongue and possible VM in left hip	Hip	Propanolol not effective

CLAPO, capillary malformation of the lower lip, lymphatic malformation predominant on the face and neck, asymmetry, and partial/generalized overgrowth; CM, capillary malformation; HPO, Human Phenotype Ontology code; LM, lymphatic malformation; N/S: molecular study not performed due to lack of affected tissue; VM, venous malformation.

^aAge at end of follow-up.

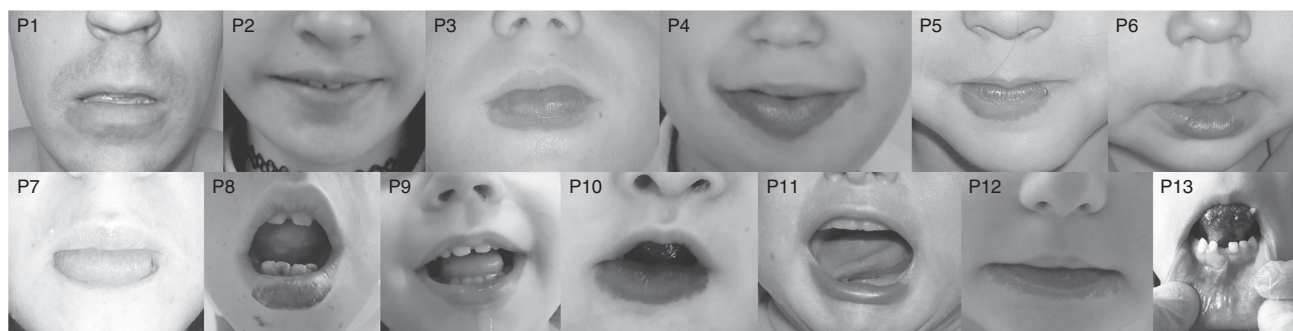


Figure 1 Capillary malformation of the lower lip, the hallmark of CLAPO syndrome, in the 13 patients reviewed. It is constantly a congenital feature, always present in the midline, symmetrical and well defined. There are three patterns: narrow midline capillary malformation (i.e., P6), entire lower lip affected (i.e. P7), and central inner area without external skin involvement (P13).

The final files encoded global information about alignments. Manual filtering was applied to determine the candidate pathogenic variants. The resulting VCF files were manually visualized with the Integrative Genomics Viewer software to verify mutations and correct annotation.

Validation of high-throughput deep sequencing variants (Sanger, pyrosequencing, and droplet digital polymerase chain reaction)

Sanger sequencing was used to confirm variants present in more than 15% of the reads in the deep sequencing data. Standard PCR and Sanger sequencing were performed using the 96-capillary ABI 3730xl ADN analyzer (Applied Biosystems, CA, USA). Long-range PCR and Sanger sequencing were also used to verify chromosomal location in variants found with high identity to another part of the genome. Pyrosequencing primers were designed using PyroMark software, and QIAGEN reagents and the PyroMark Q96 MD instrument (Qiagen, Hilden, Germany) were used according to manufacturer's protocol to confirm mosaic variants in the 5% and 15% read fraction range. Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR), able to detect and quantify somatic mosaic variants at frequencies as low as 0.1%,¹³ was used to detect/validate and quantify variants found on deep sequencing studies in less than 5% of reads or variants above 5% of reads but whose confirmation by pyrosequencing was not conclusive. We also used ddPCR to screen for the three common mutations described in PROS (*PIK3CA*: NM_006218.2: c.1624G > A, p.Glu542Lys; c.1633G > A, p. Glu545Lys; and c.3140A > G, His1047Arg) in all negative samples by high-throughput sequencing.¹⁴ The QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad, CA, USA) was used according to the manufacturer's protocol. Nucleic acid molecules were quantified using a two-color fluorescence detector (FAM channel for mutant allele and VIC channel for wild type) and six assays with well-defined and validated somatic mosaic variants were used as controls to validate the technique.

RESULTS

Clinical features

Longitudinal data for 13 patients with CLAPO was gathered for a total of 70.5 person-years (ranging from 0.8 to 10.2). The mean age at diagnosis was 8.0 years (0.6 to 30.4) and the mean age at the end of this study was 10.4 years (2.2 to 40.5). None of the patients had a relevant family history. Except for one patient of Arab descent whose parents were born in Morocco (P6), all patients in the cohort were Caucasian and had parents from the Iberian Peninsula. The cohort included eight females and five males. Among the main features of CLAPO the only common clinical manifestation was the capillary malformation (CM) of the lower lip (13/13; 100%) (**Figure 1**); all other features were present at birth or became evident postnatally. The CM of the lower lip was always present in the midline, with a symmetrical distribution, ranging from 2 to 11 cm, with well-defined borders in several patients, and often affecting the portion of the skin under the lip or the intra-oral mucosa. We observed three distinct patterns of midline CM on the lower lip: (i) five patients (P2, P5, P6, P8, P9) had a narrow midline CM with reddish color, (ii) seven patients (P1, P3, P4, P7, P10, P11, P12) had a CM that involved the entire lower lip with a predominant brown/purple color, and (iii) one patient (P13) had a CM including the central inner area of the lower lip without external skin involvement under the vermilion. In our experience, untreated isolated capillary malformations (classically called port-wine stains) evolve by a progressive thickening and darkening of the malformation due to a progressive vessel dilation, which can, in turn, produce skin overgrowth. Nonetheless, we did not observe this type of progression in the complete cohort of 13 patients with CLAPO. However, as some of the patients are very young and have been followed up for a short period of time, thickening and darkening of the CM on the lower lip in these patients cannot be ruled out in the future. Remarkably, what we did observe, based on photographs and information provided by patients and relatives, is a decreased intensity in the CM of the lower lip, usually between months 6 and 18 of age, in four (P1–3, P6) of the six patients followed more than 9 years. While midline CMs of the face are frequently

correlated with lesions of the brain in patients with megalencephaly-capillary malformation syndrome (MCAP),¹⁵ no psychomotor delay or intellectual deficit was apparent in CLAPO patients.

The second major clinical feature was the presence of lymphatic malformations (LMs), observed in 12 of 13 patients (92%). In 10 patients (P3–8, P10–13) the LM involved the lip, oral mucosa, neck, and tongue, seen in 5 of 10 with right sided predominance (P5, P6, P10–12). Another two patients (P1, P2) had unilateral LM on the lower limbs, one of which (P1) was associated with lymphedema. At birth, the tongue had a symmetrical midline combined capillary/lymphatic/venous malformation in 8 of 13 patients (P3–6, P8, P10, P12, P13) with CLAPO, which was mild, well-defined, and affected the tip of the tongue. In 5 of 8 patients (P3–5, P8, P13), the tongue lesions evolved over time, causing growth of the affected area and severe hemorrhagic events with episodes of acute inflammation, triggering and aggravating symptoms. On the other hand, P2 had a left thigh LM that was not noted until 15 years of age, indicating that an apparent absence of congenital LM does not exclude a later onset. Sporadic LMs are rare and arise more often with craniofacial venous malformations.¹⁶ In our cohort LMs of the neck, tongue, and/or limb were also observed in association with venous malformations in 11 patients (all but P2 and P7), which showed progressive increase in size and in no case involution.

In this cohort the asymmetry in 8 of 13 patients (P4–6, P8, P10–13) actually reflected a direct consequence of the presence of a LM on the face/neck, although in three patients (P1–3) there was a true asymmetric overgrowth with the presence of bony hypertrophy. In addition to the facial asymmetry, P10 had asymmetry caused by left limb undergrowth. P1 had macrodactyly and overgrowth of the right side of the body (Figure 2), and P2 had a postnatal increase in the length of the left leg. P1 and P2 were initially referred with a diagnosis of Klippel–Trenaunay syndrome.

Recently, P9 suffered a large presacral ganglioneuroma that was successfully resected, and P10 had severe failure to thrive needing gastrostomy. Those findings can eventually expand the phenotype of CLAPO syndrome.

Molecular results

Our main hypothesis was that somatic mutations were the genetic cause of CLAPO. Accordingly, we screened 20 DNA blood/saliva/tissue samples from 9 patients (P1, P2, P4, P6–10, and P13) with CLAPO using custom high-throughput deep sequencing panels including genes associated with vascular malformations and overgrowth, and a custom bioinformatic pipeline for somatic mosaic detection with a tiered analysis approach. Average read depth for Tier1 was 535×, for Tier2 342×, and for Tier3 404×, after removing duplicates. Variants were excluded as disease candidates by their presence in > 0.01 population frequency (1000 Genomes project (<http://www.internationalgenome.org/>), the National Heart, Lung, and Blood Institute Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>), the Exome Aggregation

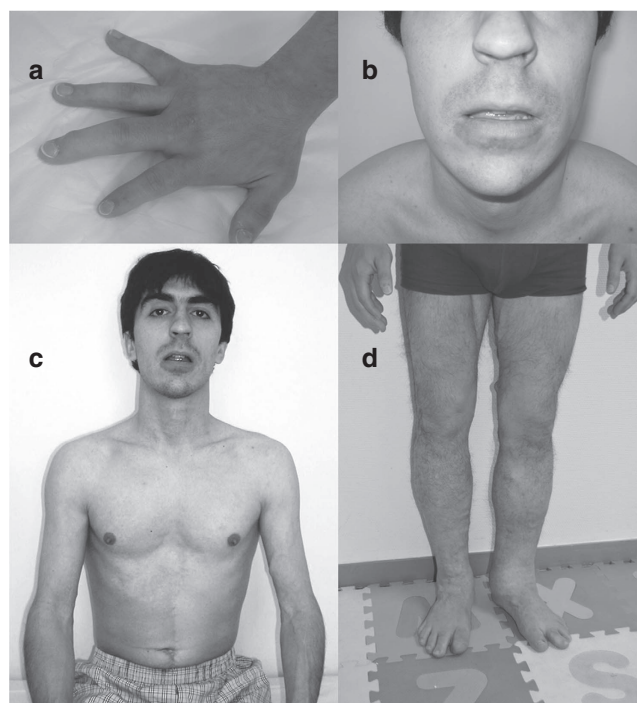


Figure 2 Patient 1. (a) Macroducty (overgrowth). (b) Capillary malformation of the full lower lip. (c) Partial asymmetry of the right side of the body associated to diffuse capillary malformation. (d) Bilateral lymphedema with predominance of foot-knee, and multiple varicose veins.

Consortium (ExAC; <http://exac.broadinstitute.org>)), by pathogenicity predictors, and by using new custom parameters developed here for somatic mosaic detection (AVAF, SampleRun). After filtering, mean variants per sample for Tier1 was 5.2, for Tier2 31.3, and for Tier3 175.6.

Our analysis identified *PIK3CA* variants in six of nine (66%) patients with CLAPO (P1, P2, P6, P9, P10, and P13). All mutations were somatic missense single-nucleotide variations with a range of mosaicism between 1.26% and 16%. We identified a total of five distinct mutations in *PIK3CA* (NM_006218.2), including one hotspot mutation (c.1624G > A; p.Glu542Lys); two recurrent, strong (gain of function) mutations (c.3140A > T; p.His1047Leu, c.1258T > C; p.Cys420Arg); one previously described mutation in patients with macroducty (c.344G > C; p.Arg115Pro); and one novel somatic *PIK3CA* mutation (c.248T > C; p.Phe83Ser) not previously described in developmental disorders (Figure 3).

All variants detected were confirmed using at least one orthogonal method based on the mosaicism percentage of the alternative allele from the next-generation candidate gene sequencing. None of the mutations detected in the patients were present (by Sanger sequencing) in the blood samples of the patient's parents. Molecular data and variant information were collected in Table 2. In the affected tissue samples from patients P4, P7, and P8 no mutation was detected. Mean *PIK3CA* reading depth of 427× (171–603) for P4, 399× (151–573) for P7, and 311× (60–583) for P8 was obtained.



Figure 3 *PIK3CA* mutations detected in patients with CLAPO. Diagram showing the distribution of the mutations detected along the *PIK3CA* domains.

DISCUSSION

In the present report we describe for the first time the presence of somatic activating *PIK3CA* mutations in patients with CLAPO, and we report an update of the phenotype and natural history of the syndrome.

Somatic mosaic mutations in *PIK3CA* have been detected in six of nine patients with CLAPO. All mutations were detected in affected tissue, in percentages ranging from 3 to 16%, and in one of the patients (P9) the mutation was also mosaic at a level of 1.26% in a blood sample. All the mutations detected are missense variants, four of which have previously been reported as causing the PROS spectrum^{9,14} and detected in different types of cancer (COSMIC database; <http://cancer.sanger.ac.uk/>). We also identified a novel *PIK3CA* mutation (Phe83Ser), not previously described in development disorders, but then again reported in the COSMIC database in three cancer samples.

The family of syndromes caused by activating *PIK3CA* mutations includes well-known and distinct entities such as MCAP, CLOVES (congenital lipomatous overgrowth, vascular malformations, epidermal nevi, and skeletal/spinal abnormalities), isolated LM, isolated adipose fibrodysplasia, and hemimegalencephaly, among others.⁹ In addition to the distribution pattern, some of the syndromes included in PROS have overlapping clinical findings with CLAPO, mainly capillary and lymphatic malformations and segmental overgrowth. However, sharing a common mutated gene does not make their formerly differentiated classification obsolete since it has implications for clinical diagnosis, evolution, and follow-up.

Our findings suggest that somatic activating *PIK3CA* mutations can be responsible for the combination of capillary, lymphatic, and venous malformation as well as the overgrowth features characteristic of CLAPO syndrome. Given the overlapping phenotypic features between CLAPO and PROS (mainly with MCAP and CLOVES), and the presence of somatic activating *PIK3CA* mutations, we postulate that CLAPO syndrome might be included into the PROS spectrum.

The multiple or reticulate and diffuse CM present in different parts of the body appear to be similar in both CLAPO and MCAP. However, one of the main clinical manifestations in CLAPO is the CM of the lower lip, a feature that is not considered characteristic of MCAP, in which midline CMs are most frequently described in upper lip, glabella, and philtrum. Anatomically, the differential involvement of the lower lip or the upper lip is distinctive and is relevant as they have distinct embryological origins and

clinical implications. The forehead, the dorsum apex of the nose, and the central part of the upper lip derive from the frontonasal prominence, whereas the chin, lower lip, and lower cheek regions derive from the mandibular prominences. These distinct embryological origins might also explain the co-occurrence of brain alterations and CM of the upper lip in MCAP and the absence of neurological involvement in CLAPO.

The second main feature in CLAPO, the LM, is also frequent in CLOVES and facial infiltrating lipomatosis. While 2 of the 13 patients described here had a LM of the legs, this type of malformation occurs in CLAPO more frequently in the cervicofacial region and tongue, where there is a clear nonrandom association with capillary or venous malformations. Venous malformations were not originally described as a main feature in CLAPO, but we now know that they are a rather frequent feature, and it has recently been described that this type of malformation can arise sporadically as a consequence of somatic activating mutations in *PIK3CA*,¹⁷ which has also been described for isolated LM.¹⁸ Since it is possible that both lymphatic and venous malformations are not apparent congenitally, the presence of CM in the lower lip should make us aware of a possible later appearance of these two types of vascular malformations. This specific and nonrandom combination of vascular malformations highlights the utility of the clinical diagnosis in patients with CLAPO.

Overgrowth is not always evident in CLAPO, as none of the patients had macrocephaly, the involvement was segmental and rarely generalized, and in the case of facial asymmetry it appears to be caused by a vascular component. As with all overgrowth syndromes, it is important to distinguish in CLAPO and PROS what is apparent asymmetry from true overgrowth caused by hyperplasia or hypertrophy. In addition, no patient with CLAPO has lipomatous overgrowth, which is a common feature in the PROS spectrum. In spite of the fact that partial/generalized overgrowth is part of the CLAPO acronym, its low frequency in this cohort of patients suggests that it should not be considered a major clinical criterion for the diagnosis of CLAPO, despite being a frequent (but not mandatory) feature in PROS.

Considering the clinical characteristics and the natural history described in our cohort of patients, CLAPO could be classified as an entity with intermediate severity in the PROS spectrum, sharing characteristics mainly with MCAP and CLOVES, and certainly with isolated forms of lymphatic and venous malformations.

Table 2 Variants detected in nine patients with CLAPO

Patient ID	Change	Frequency by deep sequencing	Frequency by confirmation technique	COSMIC ^a	Developmental disorders ^b (refs. 14,17,18,21–38)
P1 (CM: skin biopsy in right hemithorax)	PIK3CA:NM_006218.2:c.344G>C; p.Arg115Pro	12% (1,290, 171)	7.5% (pyrosequencing), 10.2% (ddPCR)	1	6
P2 (CM: skin biopsy in left inguinal region)	PIK3CA:NM_006218.2:c.248T>C; p.Phe83Ser	11% (328, 41)	9.5% (pyrosequencing)	3	0 ^c
P6 (LM: oral mucosa)	PIK3CA:NM_006218.2:c.1258T>C; p.Cys420Arg	12% (287, 39)	7.5% (pyrosequencing), 10.3% (ddPCR)	78	15
P9 (CM: skin biopsy on right leg)	PIK3CA:NM_006218.2:c.344G>C; p.Arg115Pro	16% (1,019, 195)	13.3% (pyrosequencing), 15.7% (ddPCR)	1	6
P9 (blood)	PIK3CA:NM_006218.2:c.344G>C; p.Arg115Pro	0% (217, 0)	1.26% (ddPCR)	1	6
P10 (CM: lower lip)	PIK3CA:NM_006218.2:c.1624G>A; p.Glu542Lys	10% (85, 9)	3.04% (ddPCR)	999	44
P13 (LM: tongue)	PIK3CA:NM_006218.2:c.3140A>T; p.His1047Leu	16% (87, 16)	10% (pyrosequencing), Sanger sequencing	315	30

The tissue in which the variant was detected is specified in each case. Variant frequency by deep sequencing shows the percentage of mosaicism and the number of reads for each allele (wt, alternate). Frequency by confirmation technique includes which other technique(s) were used to validate the candidate variant and its percentage. CLAPO, capillary malformation of the lower lip, lymphatic malformation predominant on the face and neck, asymmetry, and partial/generalized overgrowth; CM, capillary malformation; ddPCR, droplet digital polymerase chain reaction; LM, lymphatic malformation.

^aCancer samples with identified *PIK3CA* mutations in COSMIC database (<http://cancer.sanger.ac.uk/>; accessed June 2017). ^bNumber of patients with vascular/overgrowth disorders previously reported with the specific *PIK3CA* variant. ^cIn silico prediction for Phe83Ser: CADD 15.97 (damaging ≥ 14), gerp2 5.44 (conserved > 2.45), VEST.Pred 0.678 (damaging ≥ 0.65), Fathmm -0.54 (possibly damaging $-1.0.8$), mutation taster 0.9999 (disease-causing), LRT 0.000000999999 (deleterious).

One of the major challenges in somatic mosaicism is the detection of altered alleles in low mosaics in affected tissues. Correspondingly, the molecular diagnosis of CLAPO patients is not trivial. One limitation comes from the requirement to obtain affected tissue. Thus, the lack of success detecting *PIK3CA* mutations in three of nine of the molecularly studied patients with CLAPO does not implicate the absence of mutations in this gene, nor does it exclude the molecular diagnosis of CLAPO.

Another challenge is the bioinformatic method for the detection of somatic mosaicism. There are several computational approaches to detect somatic variants, but they cannot be applied to this problem since the starting data or the genomic landscape is different. Strelka¹⁹ for single-nucleotide variation discovery or Mutect²⁰ for indel discovery are two of the most used variant callers for somatic variant detection. However, neither of them was developed to detect variants in mosaic disorders. Thanks to the computational approach applied here, we could rescue reads with low mapping quality score due to high percent identity with other genomic regions, and call variants that were present both in somatic and mosaic state.

In conclusion, this study documents the clinical features and natural history in a well-defined cohort of patients with CLAPO, and detected activating *PIK3CA* mutations in six of nine studied affected tissues. We detected *PIK3CA* activating variants previously described as causing the PROS spectrum, together with a clinical distribution pattern distinctive of somatic mosaicism, and a constellation of nonrandom clinical manifestations that, although in combination are specific to CLAPO, are also frequent in other syndromes within the PROS spectrum. We conclude that CLAPO belongs to the PROS family of somatic syndromes. In clinical terms, the differences between CLAPO and other PROS spectrum phenotypes demonstrate that the presence of a CM in the upper lip should raise suspicion of possible neurological involvement, whereas the CM in the lower lip may be associated with later occurrence of lymphatic/venous malformations. This could reflect their distinct embryological origin but does not imply that a patient with PROS and without upper lip CM should not be monitored for possible neurological compromise. In diagnostic terms, the approach in CLAPO requires the use of appropriate samples and bioinformatic algorithms, allowing the detection of somatic mosaic variants. Because CLAPO is caused by activating mutations in *PIK3CA*, affected patients may benefit from inhibitors of this pathway. Therapeutic trials of this disorder should be undertaken.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/gim>

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the project “Genetics of vascular and lymphatic malformations” financed with funds donated by

Asociación Ultrafondo and Villareal FC, cofinanced by project IP-17 from the funding call “Todos Somos Raros” (Telemaraton TVE promoted by Fundación Isabel Gemio, Federación ASEM, and Federación Española de Enfermedades Raras), cofinanced by the Instituto de Salud Carlos III, FEDER FUNDS FIS PI15/01481, and IIS-Fundación Jiménez Díaz UAM Genome Medicine Chair. We are grateful to the patients and their families. We want to honor the memory of Angel Llopis (affected by a non-CLAPO-related vascular anomaly) and thank his father, Fernando. We also thank Leslie Biesecker of the National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, for his invaluable contribution to critically revising this work.

DISCLOSURE

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Del Pozo J, Gómez-Tellado M, López-Gutiérrez JC. Vascular malformations in childhood. *Actas Dermosifiliogr* 2012;103:661–678.
- Duffy K. Genetics and syndromes associated with vascular malformations. *Pediatr Clin North Am* 2010;57:1111–1120.
- Hagen SL, Hook KP. Overgrowth syndromes with vascular malformations. *Semin Cutan Med Surg* 2016;35:161–169.
- López-Gutiérrez JC, Lapunzina P. Capillary malformation of the lower lip, lymphatic malformation of the face and neck, asymmetry and partial/generalized overgrowth (CLAPO): report of six cases of a new syndrome/association. *Am J Med Genet A* 2008;146A:2583–2588.
- Krämer D, Cossio ML, Whittle C. CLAPO syndrome: case report. *Int J Dermatol* 2016;55:1149–1150.
- Flores-Terry MA, Zamberk-Majlis P, Cortina-de la Calle MP, García-Arpa M. CLAPO syndrome. *Actas Dermosifiliogr*; e-pub ahead of print 15 May 2017.
- Lindhurst MJ, Sapp JC, Teer JK, et al. A mosaic activating mutation in AKT1 associated with the Proteus syndrome. *N Engl J Med* 2011;365:611–619.
- Shirley MD, Tang H, Fallione CJ, et al. Sturge-Weber syndrome and port-wine stains caused by somatic mutation in GNAQ. *N Engl J Med* 2013;368:1971–1979.
- Keppeler-Noreuil KM, Rios JJ, Parker VE, et al. PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. *Am J Med Genet A* 2015;167A:287–295.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014;30:2114–2120.
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 2012;9:357–359.
- Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* 2011;27:2987–2993.
- Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 2011;83:8604–8610.
- Mirzaa G, Timms AE, Conti V, et al. PIK3CA-associated developmental disorders exhibit distinct classes of mutations with variable expression and tissue distribution. *JCI Insight* 2016;1:e87623.
- Martínez-Glez V, Romanelli V, Mori MA, et al. Macrocephaly-capillary malformation: analysis of 13 patients and review of the diagnostic criteria. *Am J Med Genet A* 2010;152A:3101–3106.
- Ewing MJ, Zreik RT, Donner LR, Zehr KJ. Large lymphaticovenous malformation resection. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2013;17:205–206.
- Limaye N, Kangas J, Mendola A, et al. Somatic activating PIK3CA mutations cause venous malformation. *Am J Hum Genet* 2015;97:914–921.
- Osborn AJ, Dickie P, Neilson DE, et al. Activating PIK3CA alleles and lymphangiogenic phenotype of lymphatic endothelial cells isolated from lymphatic malformations. *Hum Mol Genet* 2015;24:926–938.
- Saunders CT, Wong WS, Swamy S, Becq J, Murray LJ, Cheetham RK. Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs. *Bioinformatics* 2012;28:1811–1817.
- Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol* 2013;31:213–219.
- Yeung KS, Ip JJ, Chow CP, et al. Somatic PIK3CA mutations in seven patients with PIK3CA-related overgrowth spectrum. *Am J Med Genet A* 2017;173:978–984.
- Kuentz P, St-Onge J, Duffourd Y, et al. Molecular diagnosis of PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS) in 162 patients and recommendations for genetic testing. *Genet Med* 2017;19:989–997.
- Huchtagowder V, Shenoy A, Corliss M, et al. Utility of clinical high-depth next generation sequencing for somatic variant detection in the PIK3CA-related overgrowth spectrum. *Clin Genet* 2017;91:79–85.
- Chang F, Liu L, Fang E, et al. Molecular diagnosis of mosaic overgrowth syndromes using a custom-designed next-generation sequencing panel. *J Mol Diagn* 2017;19:613–624.
- Vahidnezhad H, Youssefian L, Baghdadi T, et al. Phenotypic heterogeneity in PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). *Br J Dermatol* 2016;175:810–814.
- Tripolszki K, Knox R, Parker V, et al. Somatic mosaicism of the PIK3CA gene identified in a Hungarian girl with macrodactyly and syndactyly. *Eur J Med Genet* 2016;59:223–226.
- Youssefian L, Vahidnezhad H, Baghdadi T et al. Fibroadipose hyperplasia versus Proteus syndrome: segmental overgrowth with a mosaic mutation in the PIK3CA gene. *J Invest Dermatol* 2015;135:1450–1453.
- Luks VL, Kamitaki N, Vivero MP, et al. Lymphatic and other vascular malformative/overgrowth disorders are caused by somatic mutations in PIK3CA. *J Pediatr* 2015;166:1048–1054.
- Loconte DC, Grossi V, Bozao C, et al. Molecular and functional characterization of three different postzygotic mutations in PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS) patients: effects on PI3K/AKT/mTOR signaling and sensitivity to PI3K inhibitors. *PLoS One* 2015;10:e0123092.
- Boscolo E, Coma S, Luks VL, et al. AKT hyper-phosphorylation associated with PI3K mutations in lymphatic endothelial cells from a patient with lymphatic malformation. *Angiogenesis* 2015;18:151–162.
- Maclellan RA, Luks VL, Vivero MP, et al. PIK3CA activating mutations in facial infiltrating lipomatosis. *Plast Reconstr Surg* 2014;133:12e–19e.
- Keppeler-Noreuil KM, Sapp JC, Lindhurst MJ, et al. Clinical delineation and natural history of the PIK3CA-related overgrowth spectrum. *Am J Med Genet A* 2014;164A:1713–1733.
- Emrick LT, Murphy L, Shamshirsaz AA, et al. Prenatal diagnosis of CLOVES syndrome confirmed by detection of a mosaic PIK3CA mutation in cultured amniocytes. *Am J Med Genet A* 2014;164A:2633–2637.
- Bornstein E, Bacino CA, Maliszewski K, et al. Isolated fetal macrodactyly: phenotypic and genetic disparities in mosaic overgrowth syndrome. *J Ultrasound Med* 2014;33:1305–1307.
- Rios JJ, Paria N, Burns DK, et al. Somatic gain-of-function mutations in PIK3CA in patients with macrodactyly. *Hum Mol Genet* 2013;22:444–451.
- Lindhurst MJ, Parker VE, Payne F, et al. Mosaic overgrowth with fibroadipose hyperplasia is caused by somatic activating mutations in PIK3CA. *Nat Genet* 2012;44:928–933.
- Kurek KC, Luks VL, Ayturk UM, et al. Somatic mosaic activating mutations in PIK3CA cause CLOVES syndrome. *Am J Hum Genet* 2012;90:1108–1115.
- Leiter SM, Parker VE, Welters A, et al. Hypoinsulinaemic, hypoketotic hypoglycaemia due to mosaic genetic activation of PI3-kinase. *Eur J Endocrinol* 2017;177:175–186.